

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

DANIANNI MARINHO ZARDO

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE EM MAÇÃS E SEUS PRODUTOS**

**PONTA GROSSA
2007**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

DANIANNI MARINHO ZARDO

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE EM MAÇÃS E SEUS PRODUTOS**

Dissertação apresentada à banca examinadora como um dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

**PONTA GROSSA
2007**

TERMO DE APROVAÇÃO

DANIANNI MARINHO ZARDO

AVALIAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM MAÇÃS E SEUS PRODUTOS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre para o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela comissão formada pelos professores:

Orientador:

Prof. Dr. Alessandro Nogueira
UEPG - Ponta Grossa/PR

Prof. Dr. Jorge Mancini Filho
USP – São Paulo/SP

Prof. Dr. Gilvan Wosiacki
UEPG – Ponta Grossa/PR

Ponta Grossa, 19 de setembro de 2007.

*Aos meus pais, meus irmãos e a pessoa
especial que Deus guardou para mim,
Rodrigo.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que nunca nos abandona e sabe o que é melhor para cada um de nós e a todos que contribuíram com este trabalho;

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade e condições oferecidas;

Aos Professores do Departamento de Engenharia de Alimentos pelo apoio e incentivo, em particular ao Professor Ivo Mottin Demiate e Nelci Catarina Chiquetto;

Ao *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA), em especial ao Professor Dr. Silvan Guyot por permitir a realização das análises de perfil fenólico;

À Universidade Federal do Paraná (UFPR), Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassa do Departamento de Farmácia, em especial ao Dr. Maurício Passos pela ajuda no processo de liofilização;

À Agrícola Fraiburgo/SC e a Epagri/SC pelo fornecimento das cultivares de maçãs;

Ao meu orientador Prof^o Dr. Alessandro Nogueira - espelho para minha vida profissional - pela dedicação, ensinamentos, paciência, amizade, incentivo e, sobretudo por ser responsável pelo meu crescimento como ser humano;

Aos queridos amigos Ivo e Ana Cláudia pelo apoio e estímulo no ingresso do Mestrado;

Ao Professor Gilvan pelos ensinamentos e pela pessoa especial que é;

A Professora Dr^a Carla Cristine Kanunfre e ao Professor Dr. Gilvan Wosiacki por aceitarem a fazer parte de minha Banca de Qualificação e pelas contribuições ao trabalho;

Aos Professores do Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo convívio enriquecedor, troca de ensinamentos e discussões;

À minha querida amiga, Denise, pela grande e fiel ajuda de sempre, sem ela seria impossível a realização deste trabalho;

À minha sempre disposta estagiária, Ana Paula Campos Dantas, que me socorreu nos momentos difíceis;

À minha ‘amiga-prima’ Marina pela paciência, pelos ensinamentos, ajuda no tratamento dos dados, incentivo e grande amizade;

Aos meus queridos amigos do Mestrado, Débora, Leila, Christiane, Paula, Ana Mery, Cristiane, Mary, Lúcia, Isabel, Kika, Simone, Rosa e Audie, pela amizade e por fazerem parte de minha vida;

À Rita por fazer dos laboratórios da UEPG uma extensão de nossa casa;

Aos estagiários do Grupo de Trabalho de Maçã (GTM), em especial à Aline, Sérgio e Richard pela ajuda e dedicação;

Ao Sr. Vieira, conhecido como Renatinho, pela ajuda com as fotos;

Aos meus pais e meus irmãos, simplesmente por tudo que representam em minha vida, sem eles nada disso seria possível;

Ao meu marido Rodrigo, meu grande e fiel incentivador, pela pessoa maravilhosa que é; pela compreensão e ajuda nos momentos delicados;

Enfim, a todos que souberam da importância deste trabalho;

Muito Obrigada por existirem e estarem sempre ao meu lado !!!!

RESUMO

O consumo de maçãs pode contribuir na melhoria da saúde e bem-estar pela prevenção de doenças como câncer, asma, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares. Evidências científicas indicam que os polifenóis, compostos com elevada atividade antioxidante, são os responsáveis por este efeito. Estes compostos podem variar entre as cultivares, em função do clima e das condições culturais. Como no Brasil pouco foi pesquisado em relação a esses constituintes nas maçãs, este estudo apresenta em um **primeiro** momento, a análise de diferentes cultivares, tanto na fruta inteira quanto em suas partes, com obtenção de uma classificação com resultados baixos e elevados. O epicarpo foi a parte da fruta com as maiores concentrações de fenóis e de poder antioxidante. Em cultivares com diferentes intensidades de pigmentação vermelha os teores de compostos fenólicos foram semelhantes, porém a atividade antioxidante foi diferente. No **segundo** momento a avaliação ocorreu durante o processamento de sucos e fermentados e os fatores responsáveis pela perda de fenóis foram a oxidação enzimática e a despectinização. O **terceiro** momento foi reservado para as amostras de farinha de bagaço de maçã que apresentaram altos teores de compostos fenólicos e de atividade antioxidante. Os resultados desse estudo demonstram que as maçãs brasileiras são, em grande parte, frutas com elevado potencial antioxidante. Além disso, produtos de maçãs podem ser boas fontes de compostos fenólicos antioxidantes, desde que inibidores do escurecimento enzimático estejam presentes.

Palavras-chaves: maçãs, fenóis, capacidade antioxidante, processamento, bagaço.

ABSTRACT

The apple consumption can contribute in the improvement of the health and well-being by reducing the risk the diseases such as cancer, asthma, diabetes type II and cardiovascular diseases. Scientific evidences indicate that the polyphenols, compounds with high antioxidant activity, are the responsible for this effect. These compounds can vary between varieties, in function of the climate and the cultural treatments. In Brazil little was researched in relation to these constituent in apples, this study presents in one **first** moment, the analysis of different varieties, considering the whole fruit and their parts, with elaboration of a classification with low and high values. The biggest phenol concentration and antioxidant activity was found in the epicarp. In varieties with different intensities of red pigmentation, the phenolics compounds content was similar, however the antioxidant potential was different. In one **second** moment the evaluation occurred during the juice and apple wine processing and the responsible factors for the loss of phenols were the enzymatic oxidation and the despectinization. The **third** moment was reserved for the apple pomace flour that presented high content of polyphenols and antioxidant activity. The results of this study demonstrate that Brazilian apples are fruits with high antioxidant activity. Moreover, apple products can be potent antioxidant sources, since that inhibit the browning enzymatic reaction.

Keywords: apples, phenols, antioxidant capacity, processing, pulp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Evolução da produção nacional de maçãs no período de 1971 a 2007	17
Figura 2	Estrutura química básica dos compostos fenólicos	22
Figura 3	Estrutura dos ácidos clorogênicos	24
Figura 4	Esqueleto básico difenilpropano (C6-C3-C6) dos flavonóides	25
Figura 5	Estruturas de (A) flovonols e (B) flavan-3-óis	26
Figura 6	Estrutura química dos taninos: (A) hidrolisável; (B) condensado; (C) ácido gálico	27
Figura 7	Estrutura, classificação e coloração das antocianinas em função dos radicais nos carbonos 3', 4' e 5'	29
Figura 8	Utilização do oxigênio no sistema de óxido-redução do ácido clorogênico em clorogenoquinona, induzido pela PPO	31
Figura 9	Fluxograma de obtenção dos extratos alcoólicos para análise das frutas (inteira e partes)	39
Figura 10	Fluxograma de obtenção de suco instantâneo	40
Figura 11	Fluxograma de obtenção de sucos de maçãs	41
Figura 12	Fluxograma de obtenção de sucos de maçãs na presença e ausência de inibidor do escurecimento enzimático	41
Figura 13	Fluxograma de obtenção da farinha de bagaço de maçã	43
Figura 14	Suco e triturado de maçã na presença e ausência de L-cisteína	48
Figura 15	Reação de diferentes concentrações de L-cisteína com o reativo FRAP	49
Figura 16	Curva de concentração resposta para soluções padrões de TROLOX e ácido ascórbico	52
Figura 17	Classificação de maçãs quanto à atividade antioxidante	58
Figura 18	Correlação entre fenóis totais e atividade antioxidante	59
Figura 19	Porcentagem média de cada parte da maçã	60
Figura 20	Extratos alcoólicos do epicarpo (casca), mesocarpo (polpa) e endocarpo (centro) das cultivares Gala, Fuji e Golden delicious	61
Figura 21	Amostras de maçãs com muita e pouca pigmentação vermelha: (A) cv Gala; (B) cv Royal Gala e (C) cv. Galaxy Gala	67

Figura 22	Características da fermentação alcoólica da levedura <i>S. cerevisiae</i> UVAFERM CK nos mostos varietais das cultivares Fuji, Gala e Joaquina: (A) crescimento das leveduras e utilização do nitrogênio e (B) evolução dos açúcares e produção de etanol	78
Figura 23	Efeito do processamento de fermentado de maçã nos teores de atividade antioxidante e compostos fenólicos de três mostos: (A) cv Fuji; (B) cv. Gala e (C) cv. Joaquina	81
Figura 24	Teores de fenóis totais em bagaço de maçã não oxidado (NOX) e oxidado (OX) das cultivares Fuji, Gala e Golden delicious	83
Figura 25	Atividade antioxidante em bagaço de maçã não oxidado (NOX) e oxidado (OX) das cultivares Fuji, Gala e Golden delicious	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção brasileira de maçãs (em toneladas), por grupo de cultivares	18
Tabela 2	Estatística descritiva simples da composição físico-química de 124 cultivares de maçãs brasileiras produzidas em 19 safras entre o período de 1982 a 2003	20
Tabela 3	Condições de análise cromatográfica – gradiente aplicado	44
Tabela 4	Efeito de diferentes concentrações de L-cisteína nas análises de atividade antioxidante e fenóis totais	50
Tabela 5	Estatística descritiva para análise de fenóis totais (mg.kg ⁻¹)	54
Tabela 6	Estatística descritiva da análise de atividade antioxidante (μM.g ⁻¹)	55
Tabela 7	Classificação das cultivares de maçãs em função da atividade antioxidante ..	57
Tabela 8	Fenóis totais no epicarpo, mesocarpo e endocarpo de 19 cultivares de maçãs (mg.kg ⁻¹)	62
Tabela 9	Atividade antioxidante no epicarpo, mesocarpo e endocarpo de 19 cultivares de maçãs (μM.g ⁻¹)	63
Tabela 10	Perfil fenólico das maçãs Gala, Fuji e Golden delicious (mg.g ⁻¹ , base seca) e atividade antioxidante (μM.g ⁻¹ , base úmida)	64
Tabela 11	Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas maçãs cultivares Gala, Galaxy Gala e Royal Gala, fruta inteira e suas partes	68
Tabela 12	Determinação de antocianinas e flavonóis na maçã inteira e no epicarpo das cultivares Galaxy Gala e Royal Gala	69
Tabela 13	Fator de correlação e valor de R ² entre os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante das cultivares Gala, Galaxy Gala e Royal Gala	69
Tabela 14	Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante nos sucos oxidados e não-oxidados das cultivares Galaxy Gala e Royal Gala	70
Tabela 15	Efeito do processamento do suco nos teores de fenólicos totais (mg.L ⁻¹)	73
Tabela 16	Efeito do processamento de suco na atividade antioxidante (μM.mL ⁻¹)	75
Tabela 17	Características físico-químicas dos mostos despectinizados das cultivares de maçãs Gala, Fuji e Joaquina	77
Tabela 18	Evolução dos teores de compostos fenólicos (mg.L ⁻¹) e atividade antioxidante (μM.mL ⁻¹) em diferentes produtos da maçã	79
Tabela 19	Teores de fenóis totais e atividade antioxidante em farinha de bagaço de maçã	82

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
ABPM	Associação Brasileira de Produtores de Maçãs
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFU	<i>International Federation of Fruit Juice Producers</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
PPO	polifenoloxidase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Epagri	Empresa Agropecuária Catarinense
INRA	<i>Institut National de la Recherche Agronomique</i>
OX	oxidado
NOX	não oxidado
FRAP	poder antioxidante pela redução do ferro
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazine
TROLOX	ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão
UFPR	Universidade Federal do Paraná
PTFE	poli-tetra-fluor-etileno
ANOVA	análise de variância
β -CLAMS	β -caroteno-ácido-linoléico
PCL	foto-químio-luminescência
cv	cultivar
PPV	pouca pigmentação vermelha
MPV	muita pigmentação vermelha
CV	coeficiente de variação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	AMACÇA.....	17
2.1.1	A composição das frutas	19
2.1.2	Os produtos comerciais.....	20
2.2	OS COMPOSTOS FENÓLICOS	22
2.2.1	Diferentes classes	23
2.2.2	Importância tecnológica.....	30
2.2.3	Importância nutricional.....	33
2.2.3.1	Compostos antioxidantes e seus benefícios	33
2.2.3.2	Radicais livres e a função antioxidante.....	34
2.2.3.3	Atividade antioxidante de diferentes classes	35
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	MATERIAL.....	38
4.2	MÉTODOS.....	38
4.2.1	Processamentos	38
4.2.1.1	Inibição do escurecimento enzimático.....	38
4.2.1.2	Preparo do extrato alcoólico para análise das frutas	38
4.2.1.3	Processamento dos sucos	40
4.2.1.4	Processamento de fermentado.....	42
4.2.1.5	Obtenção da farinha de bagaço de maçã.....	42
4.2.2	Análises físico-químicas	43
4.2.2.1	Determinação de compostos fenólicos totais	43
4.2.2.2	Determinação da atividade antioxidante.....	43
4.2.2.3	Determinação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).....	44
4.2.2.4	Determinação de antocianinas e flavonóis.....	46
4.2.2.5	Determinação de açúcares redutores e não-redutores.....	46
4.2.2.6	Determinação de nitrogênio total	47
4.2.2.7	Determinação de acidez total e volátil.....	47
4.2.2.8	Determinação do grau alcoólico.....	47
4.2.2.9	Análises estatísticas	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1	AValiação do inibidor do escurecimento enzimático.....	
5.2	PADRONIZAÇÃO DA ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (FRAP).....	
5.3	AValiação do teor de fenóis e atividade antioxidante em maçãs.....	
5.3.1	Classificação das maçãs de acordo com a atividade antioxidante	
5.3.2	Correlação entre fenóis totais e atividade antioxidante	

5.3.3	Distribuição na maçã
5.3.4	Perfil fenólico das cultivares Gala, Fuji e Golden delicious.....
5.4	INTENSIDADE DE PIGMENTAÇÃO VERMELHA EM MAÇÃS
5.4.1	Caracterização fenólica e antioxidante das frutas
5.4.2	Efeito no processamento de suco de maçã.....
5.5	AVALIAÇÃO FENÓLICA E ANTIOXIDANTE NO PROCESSAMENTO DE SUCOS DE MAÇÃS.....
5.5.1	Efeito das operações unitárias nos teores de fenólicos totais.....
5.5.2	Efeito das operações unitárias na atividade antioxidante
5.6	AVALIAÇÃO FENÓLICA E ANTIOXIDANTE NO PROCESSAMENTO DE FERMENTADO DE MAÇÃ
5.6.1	Características dos mostos e da fermentação alcoólica
5.6.2	Efeito do processamento nos teores de fenólicos totais e na atividade antioxidante
5.7	AVALIAÇÃO FENÓLICA E ANTIOXIDANTE DA FARINHA DE BAGAÇO DE MAÇÃ.....
6	CONCLUSÕES
	REFERÊNCIAS..... 48

1 INTRODUÇÃO

Evidências científicas demonstram o papel de frutas e vegetais na prevenção de muitas doenças crônicas não-transmissíveis e em alguns declínios funcionais associados ao envelhecimento, como diabetes, obesidade e colesterol. As substâncias que apresentam atividade antioxidante, como os polifenóis, são as responsáveis por este efeito e vem apresentando cada vez mais interesse pela comunidade científica, fato que pode ser observado no aumento do número de publicações internacionais, em periódicos especializados, que envolvem estes dois temas, de acordo com a base de dados da SciFinder Scholar® nos anos de 2000, 2005 e 2007.

A maçã, quarto lugar em produção e consumo mundial, com potencial produtivo de aproximadamente 1.000.000 ton/ano no Brasil, é considerada uma das frutas de maior atividade antioxidante em virtude da quantidade e qualidade fenólica. Na maçã, estes componentes variam de maneira considerável no que diz respeito à concentração e poder redutor, de acordo com a cultivar, condições culturais e grau de maturidade. Nesse sentido, essa dissertação traz em sua concepção três enfoques principais de estudo, os quais englobam: **(1)** a avaliação de maçãs *in natura*; **(2)** processadas, como sucos e fermentados e **(3)** o bagaço de maçã, subproduto deste processamento.

O **primeiro** avalia o potencial antioxidativo de 65 amostras de maçãs, em duas safras e diferentes regiões de cultivo, correlacionadas com seus teores de compostos fenólicos, tanto na fruta inteira quanto em suas partes (epicarpo, mesocarpo e endocarpo), sendo classificadas, por cultivar e região, de acordo com a sua atividade antioxidante. Estas informações podem ser úteis tanto ao consumidor, que tem interesse em saber qual cultivar pode ter um maior efeito benéfico para a saúde, quanto ao produtor que poderá utilizá-las na produção e comercialização do seu produto. Além disso, espera-se que em curto e médio prazo estas informações possam modificar o cenário econômico de determinadas cultivares, fato este que já está sendo discutido por instituições de melhoramento genético, como a Epagri/SC e Agrícola Fraiburgo.

O **segundo** enfoque relata o efeito de diferentes operações unitárias no teor dos compostos fenólicos e na atividade antioxidante, durante o processamento de sucos (bruto, clarificado, crioconcentrado). Estes resultados, além de avaliarem os produtos finais, identificam quais etapas se tornam mais prejudiciais para uma possível perda destes compostos. O processamento de fermentado de maçã, matéria-prima para a sidra, vinagre e

elaboração de *blends* também foi avaliado, a fim de verificar algum efeito do metabolismo das leveduras sobre os fenóis e a atividade antioxidante.

No processamento industrial de sucos e fermentados de maçã, o processo gera uma elevada quantidade de bagaço, entre 45.000 e 90.000 toneladas, fato este que estimulou o **terceiro** enfoque deste trabalho. As análises demonstraram que este subproduto, pouco valorizado e que muitas vezes torna-se um problema ambiental, apresenta um potencial antioxidante elevado, de 3 a 10 vezes maior, quando comparado à maçã *in natura*. Além disso, sabe-se que oferece elevada concentração em fibras e minerais, o que o caracteriza como um ingrediente de elevado valor nutricional para ser utilizado na formulação de alimentos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo compreende os temas referentes ao cenário da pomicultura nacional, como a produção, cultivares, composição e seus principais produtos, além dos compostos fenólicos e sua importância tecnológica e funcional.

2.1 A MAÇÃ

Dados estatísticos revelam o progresso da pomicultura no Brasil, a qual passa de uma produção incipiente na década de 70 a um crescimento gradativo, com uma perspectiva de produção elevada em 2010 (Figura 1). Segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO) em 2005 o país ocupou o 14º lugar no cultivo de maçã. Ao consumo *in natura* foram destinados 61 % da produção, enquanto para a indústria 26 % e o restante abasteceu o mercado de exportação (*World Apple and Pear Association*, 2006). Aos anos de super-safra segue-se pelo menos uma safra difícil, com baixa produção e resultados econômicos negativos, consequências de resposta fisiológica ao esgotamento energético ocorrido na estação anterior, fato conhecido como “alternância de produção” (WOSIACKI; NOGUEIRA; SILVA, 2000; WOSIACKI; NOGUEIRA, 2001; WOSIACKI et al., 2002).

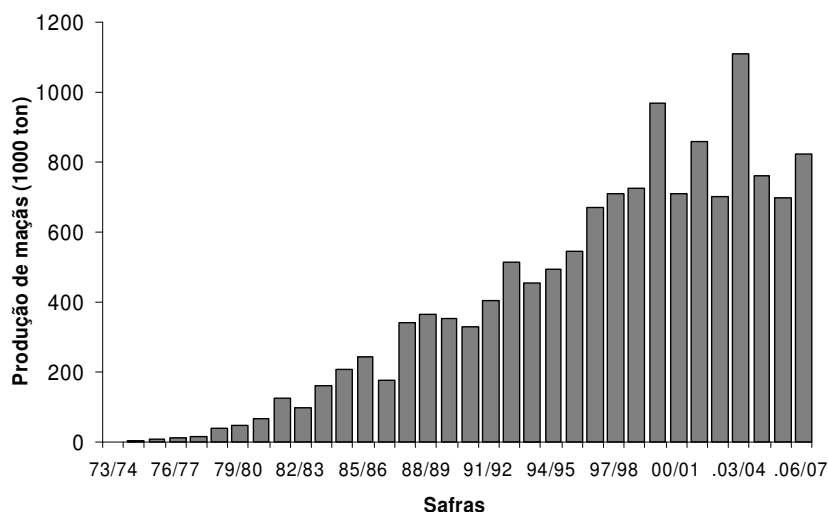


Figura 1 - Evolução da produção nacional de maçã no período de 1971 a 2007

Fonte: WOSIACKI; NOGUEIRA, 2001; WOSIACKI et al., 2002; WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005; ABPM, 2007.

Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Maçã – ABPM (2007), as regiões produtoras estão situadas em elevadas altitudes na Região Sul, com mais de 1.100 m,

compreendendo o Sul do Paraná, a região serrana de Santa Catarina e a Serra Gaúcha, as quais se encontram em franca expansão. O maior pólo produtor, a cidade de Fraiburgo em Santa Catarina, está inserido em climas cujos invernos não são tão frios para atender as exigências climáticas (DENARDI; CAMILO, 1997). Nas demais regiões, mesmo havendo invernos bem definidos, as plantas apresentam comportamentos insatisfatórios, com brotações e florescências prolongadas e desuniformes, baixa produtividade e qualidade dos frutos (EPAGRI, 2002).

A situação catarinense no tocante à pomicultura em 2002 encontra-se descrita na literatura. Neste aspecto, observa-se que de 1977 a 2002 a região manteve uma produção média de 52 a 54 % da total brasileira e de acordo com os dados históricos o prognóstico compreendia uma produção nacional de 1.050.000 toneladas em 2005 a fim de suprir o mercado com 735 mil toneladas de frutas de boa qualidade e aumentar a exportação até 105 mil toneladas, restando assim 210 mil toneladas destinadas à indústria, ainda incipientes no cenário brasileiro (WOSIACKI et al., 2002). Dados do IBGE (2006) e da *World Apple and Pear Association* (2006) demonstraram que o prognóstico não foi alcançado (Tabela 1). Na Região Sul do país, em 2005, a produção chegou a um total próximo de 760 mil toneladas; o Estado de Santa Catarina concentrou cerca de 60 %, o que somado com o Estado do Rio Grande do Sul (36 %) correspondem a 96 % do total produzido, enquanto o Estado do Paraná contribuiu com apenas 4,2 %.

Tabela 1 - Produção brasileira de maçãs (em toneladas), por grupo de cultivares

Cultivar	2003	2004	2005	2006
Fuji e mutações	278.652	357.386	300.173	276.610
Gala e mutações	380.431	579.845	437.297	402.970
Golden e Belgolden	15.178	-	-	-
Outras	26.754	50.778	22.160	20.420
Total	701.015	988.009	759.630	700.000

Fonte: *World Apple and Pear Association* (2006)

Nota: (-) dados não divulgados

O consumidor brasileiro tem preferência por maçãs de epiderme vermelha e polpa com pouca acidez como a da cultivar Red delicious (DENARDI; CAMILO, 1997), enquanto cultivares como a Willie sharp e a Granny Smith tem frutos de sabor impróprios e epiderme verde pouco apreciada. Em função deste tipo de demanda há que se considerar dois aspectos. Primeiro, a necessidade de suprir o abastecimento ao mercado interno com frutas de mesa de alta qualidade e fomentar o setor agroindustrial a utilizar as desqualificadas para o consumo *in natura* na elaboração de produtos de alta qualidade como sucos, sidras, vinagres e bebidas

alcoólicas destiladas. Segundo, mas não menos importante, dar continuidade a processos de exportação, no qual podem ser incluídos os sucos concentrados.

Para atender a expectativa do mercado interno, as cultivares Gala e Fuji, bem como suas mutações, compreendem a 90 % da produção (Tabela 1). A primeira apresenta elevada qualidade sensorial devido a sua suculência, ao sabor doce, média acidez e excelente aparência, com uma coloração vermelha rajada intensa e atraente no lado que recebe sol, embora no lado sombreado fique em destaque a cor de fundo amarelo-esverdeada (EPAGRI, 2002). A 'Fuji', uma das quatro cultivares de macieiras mais promissoras no contexto mundial (EPAGRI, 2002), apresenta tamanho médio a grande, com cor de fundo esverdeada, que se torna amarela à medida que ocorre sua maturação. A polpa é aromática, firme, crocante, muito suculenta e de sabor doce.

A mutação Royal Gala, originada na Nova Zelândia, tem coloração mais intensa que a Gala, apresenta estrias mais pronunciadas que recobrem toda superfície do fruto, porém com menor intensidade de estrias no lado sombreado. A cultivar Galaxy Gala, mutação somática da Royal Gala, mais colorida, apresenta estrias uniformemente distribuídas em toda superfície do fruto, inclusive na parte sombreada. Na Europa, estas três cultivares são classificadas como vermelho-estriada e bi-color ('Gala'), vermelho com estrias pronunciadas ('Royal Gala') e vermelho intenso e estriado uniforme ('Galaxy Gala') (EPAGRI, 2002). As mutações da cultivar Fuji também diferem na coloração vermelha do epicarpo, sendo mais comum a Fuji (1), a Fuji (2) e a Fuji Suprema.

2.1.1 A composição das frutas

Na Tabela 2 pode ser observada a composição físico-química de 124 cultivares de maçãs brasileiras produzidas em 19 safras entre o período de 1982 a 2003, que incluem teores de sólidos solúveis totais, açúcares redutores e redutores totais, fenóis totais, acidez e pH.

Os teores de sólidos solúveis totais, que compreendem os dois maiores componentes de frutas, os açúcares e os ácidos orgânicos, dão uma idéia do grau de maturação no momento do processamento, com um valor médio de $12,63 \pm 1,40$. O grau de maturação preconizado pela literatura e/ou legislação engloba valores de BRIX que vão de onze a 14, o que é confirmado na Tabela 2 pela análise de 187 amostras de maçãs.

Os açúcares redutores, determinado por uma técnica química que envolve a capacidade de açúcares simples de reduzir sais de cobre III (azul) a cobre II (vermelho),

identificam a frutose e a glucose, com valores médios de 3,21 e 1,00 g.100g⁻¹, respectivamente.

A identificação da sacarose, principal componente da fração açúcar redutor total, é realizada por hidrólise prévia por métodos químicos ou enzimáticos, calculada como diferença sem a correção relativa à molécula de água acrescida à estrutura dos monossacarídeos, expresso como g.100g⁻¹ de glucose. De acordo com a Tabela 2 é o atributo de maior amplitude nas 187 amostras analisadas, com coeficiente de variação próximo a 50 %, indicando claramente que existem diferenças entre algumas amostras e que os teores são específicos de cada genótipo.

A acidez total titulável é calculada com o fator do ácido málico, pois o conteúdo que possa ter de ácido cítrico, nunca superior a 5 %, não influi nos resultados de forma significativa. De acordo com a Tabela 2 as amostras apresentam um baixo nível, próprio para frutas de mesa. Os teores de ácido para processamento do suco de maçã devem ser maiores que 0,45 g.100g⁻¹.

A razão açúcar:ácido, índice que relaciona estes atributos serve para discriminar as frutas propícias para o processamento (valores próximos ou inferiores a 20) e para o consumo *in natura* (valores superiores a 20).

Tabela 2 - Estatística descritiva simples da composição físico-química de 124 cultivares de maçãs brasileiras produzidas em 19 safras entre o período de 1982 a 2003

Atributos, g.100g ⁻¹	N	Mínimo	Média	Máximo	Desvio Padrão	Variância	C.V., % *
Graus Brix	187	8,90	12,63	16,40	1,40	1,95	11,04
Açúcar Redutor Total	223	7,58	11,65	19,00	1,84	3,37	15,76
Sacarose	202	0,15	3,23	9,30	1,57	2,46	48,59
Açúcar Redutor	224	5,42	8,78	15,31	1,88	3,53	21,40
Frutose	163	3,21	6,31	10,78	1,55	2,40	24,54
Glucose	172	1,00	2,07	3,78	0,61	0,37	29,37
Fenóis (mg.L ⁻¹)	138	101	315	833	25,44	15.734	39,82
Acidez Total	226	0,086	0,376	1,118	0,174	0,030	46,21
pH (adimensional)	121	2,91	3,55	4,33	0,33	0,11	9,30

Fonte: WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005 (adaptado).

Nota: *coeficiente de variação

2.1.2 Os produtos comerciais

As maçãs industriais, com baixo valor comercial, apresentam defeitos mecânicos ou relacionados com a forma (formato ruim, coloração desuniforme, pequeno tamanho e algumas cicatrizes), que as desclassifica para consumo *in natura*. Estas frutas podem ser utilizadas para

processamento de suco, além de fabricação de sidra, vinagre e destilados, dependendo dos problemas físico-sanitários apresentados (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005).

Quanto ao processamento de sucos, as características de cada cultivar e os fatores como região de plantio (solo e clima) e fatores agronômicos (adubação, tratamentos fitossanitários) podem vir a interferir no produto final (JANZATTI; FRANCO; WOSIACKI, 2003). As frutas com teores elevados de açúcar e de ácidos são as melhores para elaboração de suco, mas, as substâncias aromáticas e os compostos fenólicos (SCHIEBER; KELLER; CARLE, 2001) estão sendo observados dentro das características das frutas.

Além destas características, fatores como condições de transporte (BABSKY; WROLSTAD; DURST, 1989), armazenagem (DRAKE; ELFVING; EISELE, 2002) e o processamento (SPANOS; WROLSTAD; HEATHERBELL, 1990; WROLSTAD et al., 1989) são conhecidos por afetar a composição química e sensorial de sucos de maçã, além de interferir no seu valor nutricional e nos parâmetros microbiológicos e toxicológicos.

Para a obtenção de suco de maçã utilizam-se operações unitárias como, por exemplo, lavagem, trituração, prensagem, centrifugação, filtração, concentração e pasteurização; além de tratamentos químicos (adição de açúcar, enzimas, uso de aditivos), que podem afetar o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

A sidra, produto da agroindústria da maçã, pode ser definida como bebida frisanse de baixo grau alcoólico obtida exclusivamente do processamento de maçãs. A legislação brasileira apresenta a seguinte definição:

Sidra é a bebida com graduação alcoólica de quatro a oito por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela fermentação alcoólica do mosto de maçã, podendo ser adicionada de suco de pêra, em proporção máxima de trinta por cento, e sacarose não superior aos açúcares da fruta (BRASIL, 1974).

As maçãs destinadas para o processamento de sidra, no Brasil, são provenientes do descarte comercial. Para Jarvis (2001) as frutas para obtenção de sidra devem possuir as seguintes características: [1] sabor doce, baixa acidez e alto teor de taninos [2] sabor amargo, alta acidez e alto teor de taninos [3] baixa acidez e poucos taninos. Como no Brasil a maior disponibilidade no setor industrial consiste nas cultivares Gala e Fuji, não existe, ainda, atitude concreta no sentido de buscar frutas mais adequadas para este processamento.

O suco obtido com auxílio de prensas de pistão ou esteiras, para obtenção da sidra, passa a ser beneficiado com adição de enzimas pectinolíticas em dosagens recomendadas pelos fabricantes, além de uma primeira sulfitagem. Após a despectinização e precipitação, o

mosto é trasfegado e deixado para fermentar naturalmente com as leveduras presentes na fruta ou recebe o inóculo sob a forma de levedura seca ativa (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005).

Como acontece durante o processamento do suco, a composição dos compostos fenólicos em mostos e sidras vai depender da cultivar de maçã utilizada no processo, grau de maturação e do tipo de extração durante a prensagem (LEA; ARNOLD, 1978). Durante o processamento destes produtos, a concentração dos fenóis poderá ser modificada pela ação da enzima polifenoloxidase, nas etapas de trituração e clarificação e, também, pela formação de precipitados.

O resíduo de extração do suco de maçã – o bagaço – principal sub-produto da agroindústria da maçã (HANG, 1987), resultante do processo de prensagem, constitui-se por todas as partes da fruta (epicarpo, mesocarpo e endocarpo). Sua composição química engloba água (75-87 g.100g⁻¹), ácidos carboxílicos, açúcares, fibras e compostos fenólicos (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005) em quantidades variáveis.

No Brasil, é utilizado como ração animal, que muitas vezes, em virtude de resíduos de açúcares associado às elevadas temperaturas e carga microbiana, fermenta e causa sintomas de diarreia e alterações sensoriais no leite. Porém este resíduo, com tratamentos adequados pode ser utilizado na incorporação de alimentos, produção de etanol, aromas, gás natural, ácido cítrico, pectinas, enzimas, cogumelos, extração de fibras e carvão vegetal (DOWNING, 1989).

2.2 OS COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos, metabólitos secundários de plantas, presentes em alimentos, (VAN SUMERE, 1989; SHAHIDI, 2002) podem ser definidos como substâncias que contém um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilas (Figura 2), que os torna diferentes na reatividade (SHAHIDI; NACZK, 1995; ESKIN; PRZYBYLSKI, 2001).

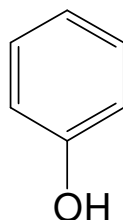


Figura 2 - Estrutura química básica dos compostos fenólicos

Fonte: SHAHIDI; NACZK, 1995.

A composição dos compostos fenólicos em frutas, característica de cada cultivar, (PÉREZ-ILZARBE; HERNÁNDEZ; ESTRELLA, 1991), pode variar devido ao grau de maturação, ambiente de plantio e condições de estocagem (SPANOS; WROLSTAD, 1992). As plantas e os alimentos contêm uma variedade de derivados fenólicos, que incluem fenóis simples, fenilpropanóides, derivados do ácido benzóico, flavonóides, estilbenos, taninos e ligninas. Juntamente com os ácidos carboxílicos de cadeia longa, podem ser encontrados os fenólicos componentes de suberina e cutina, substâncias essenciais para o crescimento e reprodução de plantas (BUTLER, 1992). Além disso, os fenóis podem atuar na pigmentação de fertilizantes, ação antibiótica e como agentes protetores contra radiação ultravioleta (UV) (SHAHIDI; NACZK, 2004).

O conteúdo total de polifenóis, em muitas cultivares de maçãs, encontra-se entre 1.000 e 6.000 mg.kg⁻¹ de peso fresco (GOLDING et al., 2001; GUYOT et al., 1998) e, segundo Gorinstein et al (2001), estes valores podem alcançar até 10.000 mg.kg⁻¹.

2.2.1 Diferentes classes

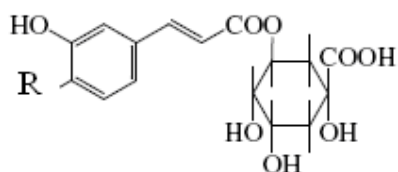
Os compostos fenólicos em maçãs, classificados em **ácidos fenólicos e flavonóides**, aparecem distribuídos de forma desigual durante o desenvolvimento da fruta (AWAD; DE JAGER; VAN WESTING, 2000), devido ao comportamento não uniforme durante sua síntese (AWAD, 2001). Os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos aparecem como representantes dos ácidos fenólicos e, a classe dos flavonóides engloba os flavan-3-óis (catequina, epicatequina e procianidinas), as antocianinas, os flavonóis (quercetina) e as dihidrochalconas (floreína e floadedzina) (GUYOT et al., 1997, GUYOT et al., 1998, GUYOT et al., 2001; SPANOS; WROLSTAD, 1992; AWAD; DE JAGER; VAN WESTING, 2000).

Para se estabelecer o perfil fenólico na maçã, entretanto, é muito mais complicado, devido, por exemplo, à polimerização dos flavan-3-óis que podem ser encontrados na forma de monômeros, oligômeros e polímeros, como as procianidinas e à glicosilação de outros compostos fenólicos (TSAO et al., 2005).

Importantes no perfil fenólico da maçã, os derivados do ácido hidroxicinâmico, apresentam um anel aromático com uma cadeia constituída por três carbonos, denominada de fenilpropanóide, sendo os mais comuns o *p*-cumarínico, o ferúlico, o caféico e o sináptico. Esses ácidos existem nas plantas na forma de ésteres, mas podem aparecer ligados às

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

Os ácidos hidroxicinâmicos, encontrados em todas as partes da maçã, têm como principais representantes os ácidos clorogênicos (Figura 3). Este ácido fenólico está distribuído de forma desigual, sendo que contribui com 79 % do total no epicarpo, 76 % no mesocarpo, 79 % no epicarpo e 87 % na semente (GUYOT et al., 1998). Podsędek et al. (2000) reportaram o conteúdo de ácido clorogênico em dez cultivares produzidas nos Estados Unidos e demonstraram teores que oscilaram de 30 a 430 mg.kg⁻¹ de peso fresco, contra um estudo realizado por Sanoner et al. (1999) onde de 14 cultivares de maçãs francesas, o conteúdo deste composto variou entre 132 e 967 mg.kg⁻¹ de peso fresco. Entretanto, estes compostos são importantes substratos para a polifenoloxidase, contribuindo na formação de pigmentos marrons e na oxidação de outros compostos fenólicos, como os flavan-3-óis, por mecanismo acoplado (NICOLAS et al., 1994; OSZMIANSKI; LEE, 1990), o que resulta em perdas nutricionais.



R = H Ácido 5-*p*-cumaroilquínico
 R = OH Ácido 5-cafeoilquínico
 R = OCH₃ Ácido 5-feruloilquínico

Figura 3 - Estrutura dos ácidos clorogênicos
 Fonte: MONTEIRO, TRUGO; 2005 (adaptado).

A perda de dois carbonos da molécula do fenilpropanóide forma os derivados do ácido benzóico (RASKIN, 1992) como o ácido catequínico, o ácido vanílico e o ácido gálico (SCHUSTER; HERRMANN, 1985). A descarboxilação do ácido benzóico e de fenilpropanóides levam à formação de fenóis simples, como fenol, *o*-cresol, 4-etilfenol, guaiacol, 4-vinilguaiacol e eugenol encontrados em muitas plantas (PYYSALO; TORKKEWLI; HONKANEN, 1977).

Os flavonóides têm o esqueleto básico difenilpropano (C6-C3-C6), com níveis de oxidação diferente do anel pirano central (Figura 4), formados por condensação de um fenilpropano (C6-C3) com participação de três moléculas de malonil coenzima-A, o que conduz à formação de chalconas, que ciclizam sob condições ácidas. Dependendo da

substituição e número de insaturações, flavonóis e flavan-3-óis podem ser formados (SHAHIDI; NACZK, 2004).

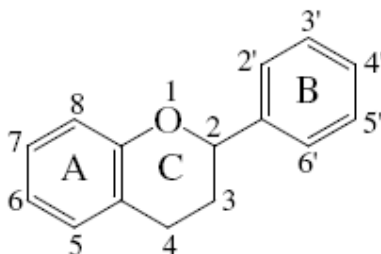


Figura 4 - Esqueleto básico difenilpropano (C6-C3-C6) dos flavonóides
Fonte: SPANOS; WROLSTAD, 1992 (adaptado).

O termo flavonóides, usado em um contexto amplo, inclui compostos sem cor, como os flavan-3-óis e coloridos como as antocianinas, que variam desde a cor vermelha até a azul. Por um período, foram referidos como *Vitamina P*, devido a sua habilidade para diminuir a fragilidade e permeabilidade capilar e também o termo *Vitamina C2* foi usado, pelo fato de alguns flavonóides demonstrarem atividade semelhante à vitamina C. As funções desta classe envolvem não somente a coloração das plantas (JOVANOVIC et al., 1998), mas também a proteção contra a radiação ultravioleta do sol e contra o ataque de parasitas, além de regularem certas reações enzimáticas (COOPER-DRIVER; BHATTACHARYA, 1998; JOHNSON, 1998; JOVANOVIC et al., 1998). A adstringência associada com flavonóides, mais especificamente com os taninos, origina-se de sua habilidade em precipitar proteínas, o que leva a formação de estruturas moleculares insolúveis na saliva (SHI; MAZZA; MAGUER, 2002).

Os flavonóides, compostos largamente distribuídos no reino vegetal, encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas (HOULIHAN; HO; CHANG, 1985); apresentam estrutura fenilbenzopirona, sendo que os compostos pertencentes a este grupo diferem entre si pelo número e posição das hidroxilas e metoxilas presentes nos dois anéis aromáticos (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

Maças expostas à radiação solar possuem, em sua casca, maior concentração de compostos flavonóides (AWAD; DE JAGER; VANDERPLAS, 2001), isto porque muitas enzimas envolvidas na síntese destes compostos são induzidas pela luz (LANCASTER, 1992).

I - Flavan-3-óis

Esta classe compreende as catequinas, epicatequinas e proantocianidinas. As catequinas presentes em maçãs são (+)catequina e (-)epicatequina (Figura 5), que representam 6 a 21 % do total de compostos fenólicos no córtex de frutas maduras.

O conteúdo de catequina pode variar de 0 a 154 mg.kg⁻¹ de peso fresco, enquanto a concentração de epicatequina oscila entre 0 e 1.410 mg.kg⁻¹ de peso fresco (SANONER et al., 1999; VAN DER SLUIS et al., 2001). A epicatequina, dependendo da cultivar, pode estar presente na casca (epicarpo) de maçãs em conteúdo até dez vezes maior do que o encontrado na polpa (BURDA et al., 1990). As procianidinas, por sua vez, encontradas na totalidade da fruta, representam 65,0 e 74,5 % dos compostos fenólicos totais nos tecidos do epicarpo e mesocarpo das maçãs, respectivamente; sua concentração aumenta de maneira gradual, 1.232 mg.kg⁻¹ na semente para 4.964 mg.kg⁻¹ no epicarpo (GUYOT et al., 1998).

As catequinas e o ácido clorogênico propensos à oxidação enzimática, participam do desenvolvimento de pigmentos marrons em maçãs danificadas (NICOLAS et al., 1994). Além disso, a (+)catequina, em conjunto com a (-)epicatequina, contribuem para a doçura e adstringência da sidra e para a formação de *haze* no suco de maçã clarificado (BEVERIDGE; HARRISON; WEINTRAUB, 1997).

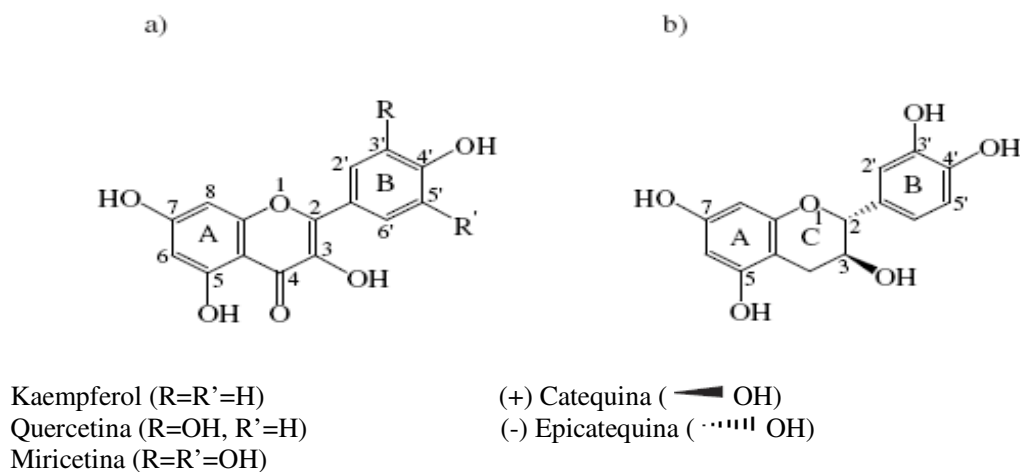


Figura 5 - Estruturas de (a) flavonols e (b) flavan-3-óis

Fonte: SPANOS; WROLSTAD, 1992 (adaptado).

Os taninos, compostos que incluem constituintes oligômeros e polímeros, distribuídos em plantas (HEMINGWAY, 1989) e encontrados em altas quantidades nas cascas de certas árvores, como o carvalho, apresentam a capacidade de precipitar proteínas em soluções aquosas, formando complexos com polissacarídeos, ácidos nucleicos e alcalóides (OZAWA;

TERENCE; HASLAM, 1987). Dependendo de sua estrutura, podem ser definidos como hidrolisáveis ou condensados (Figura 6), sendo este último também conhecido como proantocianidóis (SHAHIDI; NACZK, 1995).

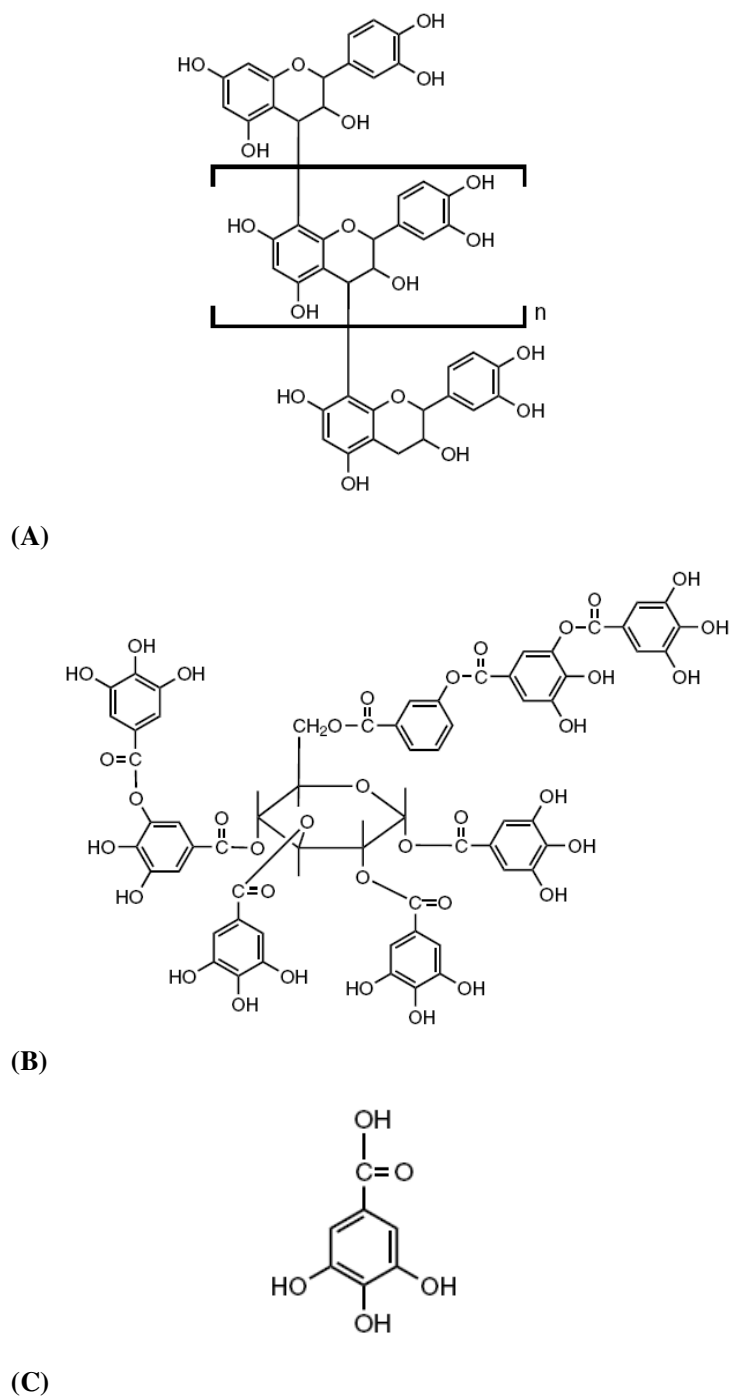


Figura 6 - Estrutura química dos taninos: (A) hidrolisável; (B) condensado; (C) ácido gálico
Fonte: SHAHIDI; NACZK, 1995.

Os taninos condensados, distribuídos por todo o mesocarpo da fruta, porém com maiores concentrações no epicarpo (SHAHIDI; NACZK, 1995), aparecem como dímeros, oligômeros e polímeros de flavonóides, especificamente de flavan-3-óis. Quando hidrolisados apresentam-se como ácidos gálicos glicosilados, incluindo galotaninos e elagitaninos (FERREIRA; LI, 2000; KHANBABAEE; VAN REE, 2001), com peso molecular variando entre 500 a 2800 Da ou mais (HADDOCK et al., 1982).

Os grupos fenólicos de taninos ligam-se com grupos-NH de peptídeos e proteínas e previnem sua hidrólise e digestão *in vivo*, o que os designa como fatores anti-nutricionais. Por outro lado, os taninos inativam enzimas, protegendo as plantas contra ataque de microorganismos (SHAHIDI; NACZK, 2004).

II - Antocianinas

A estrutura básica das antocianinas é o cátion flavilium (SHAHIDI; NACZK, 1995), classificadas de acordo com o número e posição de seus grupos hidroxila e metoxila no núcleo flavan (JACKMAN et al., 1987). A introdução de um ou mais grupos hidroxila na posição 3' e 5' do anel fenila, e suas sucessivas metilações, formam cinco antocianinas com colorações diferentes. Estes compostos podem estar ligadas à antocianidinas, na forma glicosilada e podem ocorrer como mono ou diglicosídeos de pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (Figura 7).

As antocianinas, pigmentos coloridos solúveis em água, presentes em muitas flores e frutas, assumem diferentes cores quando submetidas à variação de pH. As catequinas e epicatequinas, encontradas em diferentes plantas e em altas concentrações em folhas de chá verde, são similares em sua estrutura com a antocianidina, contudo, incolores (MAZZA; MINIATI, 1994; JACKMAN; SMITH, 1996).

Há presença de muitas antocianinas no epicarpo de maçãs – cianidina-3-galactosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, malvidina-3-glucosídeo e malvidina-3,5-diglicosídeo – com predominância da cianidina-3-galactosídeo (ALONSO-SALCES et al., 2001; TIMBERLAKE; BRIDLE, 1971; VAN DER SLUIS et al., 2001). O aumento do número de resíduos de açúcar confere aumento de estabilidade e solubilidade em água das antocianinas, comparado com as antocianidinas (SHI; MAZZA; MAGUER, 2002).

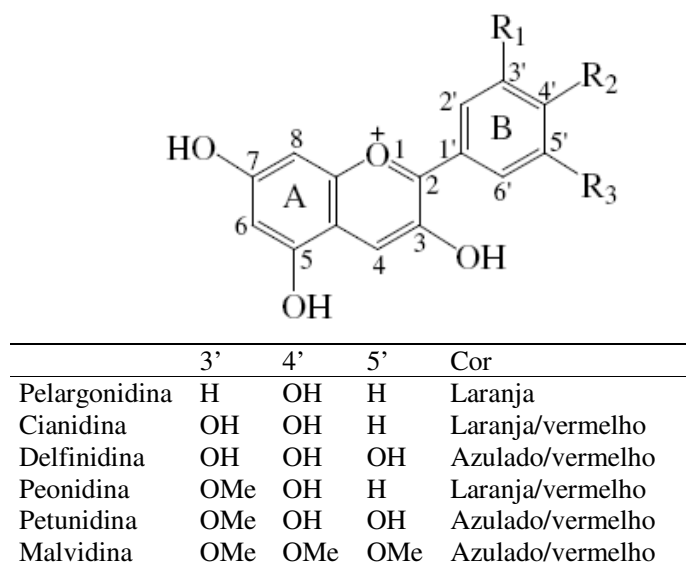


Figura 7 - Estrutura, classificação e coloração das antocianinas em função dos radicais nos carbonos 3', 4' e 5'

Fonte: SHI; MAZZA; MAGUER, 2002.

III - Flavonol

Os glicosídeos de flavonol, quantitativamente considerados a menor classe de compostos fenólicos das maçãs, encontrados predominantemente no epicarpo (GUYOT et al., 1998; VAN DER SLUIS et al., 2001), estão envolvidos na regulação da textura, agindo como inibidores da β -galactosidase (DICK; SMITH, 1990; DICK et al., 1985; LIDSTER; MCRAE, 1985; LISTER; LANCASTER; SUTTON, 1994).

Os flavonols, 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), mais comuns encontrados em frutas são a quercetina, miricetina e kaempferol (GUYOT et al., 1998; VAN DER SLUIS, et al. 2001).

IV - Dihidrochalconas

Os principais compostos desta classe encontrados em maçãs incluem a floretina e floedzina. As dihidrochalconas podem complicar ainda mais o perfil fenólico, por serem compostos associados com glicose e xiloglicose, na maioria das vezes, e pelo fato de poder ocorrer, na posição-3', oxidação (GUYOT et al., 1998; AWAD; DE JAGER; VAN WESTING, 2000; TSAO; YANG, 2003).

2.2.2 Importância tecnológica

A importância tecnológica dos compostos fenólicos presentes em frutas e vegetais e, por consequência em seus produtos, está relacionada com características sensoriais, como o sabor adstringente e amargo, além de contribuírem com a cor e estarem envolvidos no escurecimento enzimático e formação de *haze*.

A oxidação enzimática acarreta um escurecimento de alimentos, como batatas, bananas e maçãs. Esta reação, catalisada pela polifenoloxidase, promove a oxidação de compostos fenólicos como resultado da interrupção da integridade celular (ESKIN, 1990), quando injúrias, cortes e outros danos mecânicos permitem a penetração de oxigênio (WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003). Os substratos fenólicos naturais necessários para esta reação, como os ácidos clorogênicos, estão separados da enzima em organelas e, por isso, o escurecimento não ocorre (WHITAKER, 1994).

A habilidade para catalisar reações de oxidação de compostos fenólicos (SHAHIDI; NACZK, 1995) da polifenoloxidase, pode ser explicada pela hidroxilação de monofenóis para *o*-difenois e pela eliminação de um hidrogênio do *o*-difenol, originando uma quinona, demonstrando uma atividade cresolase e catecolase da enzima, respectivamente (WHITAKER, 1994). A Figura 8 demonstra a utilização do oxigênio no sistema de óxido-redução do ácido clorogênico com posterior formação de melanoidinas, o que resulta em uma modificação na concentração dos compostos fenólicos e no potencial antioxidante (NOGUEIRA et al., 2003). As *o*-quinonas desta reação podem modificar proteínas devido à interação com seus grupos amino e sulfidrilos (MATHEIS; WHITAKER, 1984), além de poder oxidar compostos de baixo potencial de oxi-redução, como as antocianinas, para produtos incolores (MATHEW; PARPIA, 1971).

O escurecimento enzimático é responsável por cerca de 50 % de perdas em algumas frutas tropicais (WHITAKER, 1994), fato importante durante a avaliação da qualidade de frutas e vegetais, no período de pós-colheita, de estocagem e de processamento (WHITAKER; RAMÍREZ; VIRADOR, 2003). Muitos estudos foram desenvolvidos para a mudança na coloração devido ao escurecimento enzimático, entre eles o suco de maçã clarificado merece destaque devido à maior aceitação (RICHARD et al., 1991; RICHARD-FORGET et al., 1992).

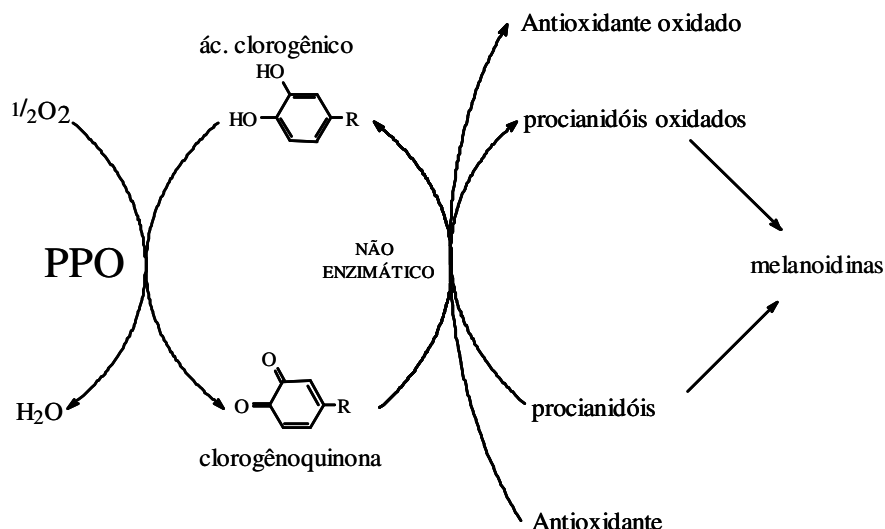


Figura 8 - Utilização do oxigênio no sistema de óxido-redução do ácido clorogênico em clorogênoquinona, induzido pela polifenoloxidase (PPO)

Fonte: NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005.

A polifenoloxidase pode ser inativada por vários métodos entre os quais se pode citar a aplicação de calor por um tempo suficiente para desnaturar a proteína (SHAHIDI; NACZK, 1995), diminuição de pH (ESKIN, 1990) e utilização de substâncias inibidoras, como os sulfitos, ácido ascórbico e compostos tiólicos, que podem atuar na inibição da enzima, ou interagir com intermediários da oxidação enzimática ou mesmo com agentes redutores, reconvertendo as quinonas aos compostos fenólicos originais (NOGUEIRA et al., 2003).

Alguns compostos fenólicos não servem como substratos da reação de escurecimento enzimático, mas podem atuar como sinergistas ou inibidores da polifenoloxidase (SHAHIDI; NACZK, 1995), entre eles encontra-se o ácido *p*-cumarínico que, segundo Shannon e Pratt (1967), é um inibidor não-competitivo desta enzima.

O ácido ascórbico, mundialmente usado, previne o escurecimento enzimático por reduzir as quinonas formadas para seus compostos fenólicos originais (WALKER, 1977). Segundo estudos de Son, Moom e Lee (2001) uma observação inicial em pedaços de maçãs tratados com solução de ácido ascórbico a 1 % parecem inibir efetivamente o desenvolvimento de pigmentos melanoidínicos.

Os aminoácidos que contém enxofre em sua estrutura química são conhecidos por sua atividade anti-escurecimento e eficiência em batatas (GURBUZ; LEE, 1997) e maçãs (GOERGE et al., 1999). Contudo, o mecanismo exato de inibição destes compostos na polifenoloxidase não está ainda esclarecido. Kahn (1985) propôs que a cisteína reage diretamente com a enzima e forma complexos estáveis com o cobre. Sabe-se que este

composto reage com produtos da quinona e formam conjugados incolores (MOLNAR-PERL; FRIEDMAN, 1990; RICHARD-FORGET et al., 1991). Porém, estes inibidores em altas concentrações, podem produzir um odor desagradável em frutas e vegetais (MATHEW; PARPIA, 1971).

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

A presença de compostos fenólicos naturais em produtos alimentícios interfere na qualidade nutricional e sensorial. Quando presente em baixas concentrações, estes constituintes podem proteger o alimento da deterioração oxidativa e, em altas concentrações, podem participar da descoloração do alimento, interagindo com proteínas, carboidratos e minerais (SHAHIDI; NACZK, 1995).

Além da reação de escurecimento enzimático, características como coloração e *flavor* dos alimentos fazem parte da importância tecnológica dos compostos fenólicos (HARBONE, 1988). O diversificado grupo dos flavonóides, entre eles as antocianinas, garante as cores vermelho, azul e violeta de muitas frutas, vegetais, sucos de frutas e vinhos (MAZZA; MINIATI, 1994). A cor de cada pigmento antociânico depende do grau de hidroxilação e metilação do cátion flavilium (BRAVERMAN, 1963). Alterações de pH, presença de íons metálicos, mistura de pigmentos e co-pigmentos afetam o teor total destes compostos (BROUILLARD, 1983; MAZZA; MINIATI, 1994). Sua estabilidade durante o processamento depende da composição do alimento, assim como condições do processo (temperatura, luz, químicos orgânicos) e contaminação com íons metálicos (SHAHIDI; NACZK, 1995).

As moléculas de antocianinas, compostos solúveis em água, podem ser encontradas *in natura* na forma de 3-monoglicosídeos ou 3,5-diglicosídeos, associados aos açúcares glicose, arabinose, xilose, galactose e ramnose (SHAHIDI; NACZK, 1995). Moléculas agliconas das antocianinas, por processo hidrolítico, promovem perda de coloração durante congelamento e descongelamento de frutas e vegetais e, também, durante o processamento e estocagem de produtos de plantas (SHAHIDI; NACZK, 1995) por serem compostos instáveis.

Compostos fenólicos de baixo peso molecular promovem precipitação de proteínas salivares (BATE-SMITH, 1973), sensação conhecida como adstringência. A presença destes fenóis, denominados de taninos, pode afetar a aceitabilidade de muitos produtos, como a sidra e o suco de maçã (SHAHIDI; NACZK, 1995).

Durante a maturação de frutas há uma perda de adstringência, com uma diminuição no teor de taninos concomitantemente (BEVERIDGE; HARRISON, 1984; GOLDSTEIN; SWAIN, 1965). Segundo Goldstein e Swain (1965), esta perda ocorre provavelmente devido à polimerização dos taninos com subsequente perda de sua habilidade em precipitar proteínas; Osawa, Terence e Haslam (1987) sugerem uma correlação com a formação de quelatos entre os taninos e macromoléculas ou outros compostos fenólicos.

A estocagem de bebidas como vinhos, cervejas e sucos de frutas, promove uma reação de condensação entre os compostos fenólicos ou uma interação com moléculas de proteínas, formando um complexo que pode sedimentar (HEATHERBELL, 1984; OH; HOFF, 1987; SHAHIDI; NACZK, 1995) denominado de *haze*, com alterações em termos de sabor (JOSLYN; GOLDSTEIN, 1964).

2.2.3 Importância nutricional

A procura de alimentos que possam trazer benefícios para a saúde e bem-estar está cada vez maior. O aumento no consumo de frutas e vegetais têm sido amplamente reconhecido, em pesquisas epidemiológicas, por terem um efeito protetor contra vários tipos de cânceres e contra doenças cardiovasculares (SHAHIDI, HO, 2000; SHAHIDI, FINLEY, 2001). Os compostos fenólicos estão entre os fitoquímicos que podem prevenir o aparecimento destas doenças, tendo seus efeitos via ação antioxidante, minimizando o estresse oxidativo e suas conseqüências.

2.2.3.1 Compostos antioxidantes e seus benefícios

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), antioxidantes são substâncias usadas para preservar os alimentos por retardar deterioração por rancidez ou descoloração devido a processos oxidativos (DZIEZAK, 1986; ADEGOKE et al., 1998). Esses compostos podem atuar em células de membranas e/ou produtos alimentícios por diversos mecanismos: (1) eliminando radicais livres, que iniciam o processo oxidativo; (2) inativando íons metálicos; (3) removendo espécies reativas de oxigênio; (4) quebrando o início da reação em cadeia; (5) eliminando oxigênio *singlet* e, (6) destruindo peróxidos para prevenir a formação de radicais (DZIEZAK, 1986; POKORNI, 1991; SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992).

Os antioxidantes em alimentos podem ser originários de compostos naturalmente presentes em gêneros alimentícios, como nas frutas, ou serem substâncias formadas durante o processamento. Os compostos fenólicos, antioxidantes naturais, ocorrem em todas as partes

das plantas (SHAHIDI; NACZK, 1985), entre eles pode-se citar os compostos flavonóides, derivados do ácido cinâmico, cumarinas, tocoferóis e ácidos orgânicos polifuncionais (PRATT; HUDSON, 1990).

2.2.3.2 Radicais livres e a função antioxidante

O elemento químico oxigênio, essencial para a vida, também atua como uma substância tóxica, originada através de processos que desencadeiam a formação de radicais livres, compostos instáveis e altamente reativos que contêm elétrons desemparelhados. A maioria destes radicais surge durante o metabolismo normal. Células do sistema imune do organismo podem utilizá-los para neutralizar vírus e bactérias. Porém, fatores ambientais como poluição, radiação, fumo e pesticidas podem gerar a formação de radicais. Assim, eles podem produzir efeitos benéficos, mas também podem induzir a oxidação e causar sérios danos celulares, se gerados em excesso (KAUR; KAPOOR, 2001).

Na tentativa de ganhar estabilidade os radicais livres reagem com moléculas estáveis mais próximas no intuito de capturar elétrons. Esta molécula, por sua vez, perde seu elétron e torna-se um radical livre (KAUR; KAPOOR, 2001). Uma vez que se inicia o processo, ele pode desencadear uma reação em cadeia, o que gera uma peroxidação lipídica, que resulta em desestabilização e desintegração das membranas das células ou oxidação de outros componentes celulares, como proteínas e DNA, que promove o rompimento das células (HALLIWELL et al., 1995).

Várias enzimas e antioxidantes de baixo peso molecular presentes no organismo humano atuam como um sistema de defesa efetivo para eliminar os radicais livres por doação de elétrons (KAUR; KAPOOR, 2001). Na produção em excesso destes radicais durante o estresse oxidativo, o organismo por si só não consegue eliminá-los, o que pode gerar um acúmulo. Os compostos fenólicos podem aliviar este estresse oxidativo e suas conseqüências, devido a suas características de compostos antioxidantes.

A ação antioxidante dos polifenóis, oriunda de suas propriedades redox, os permite atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio e eliminadores de oxigênio *singlet* (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997). Um composto polifenólico pode ser definido como um antioxidante quando: (a) está presente em baixas concentrações relativas ao substrato a ser oxidado, o que pode atrasar, retardar ou prevenir a oxidação; (b) os produtos formados após a eliminação dos radicais livres devem ser estáveis (KAUR; KAPOOR, 2001).

2.2.3.3 Atividade antioxidante de diferentes classes

A maioria das investigações feitas com compostos antioxidantes naturais restringe-se à verificação da atividade destas substâncias sem, contudo, isolarem e identificarem o composto ativo. A determinação da atividade antioxidante nestes produtos teve início com Chipault et al. (1952), em especiarias. A partir desta data, pesquisadores fazem pesquisas sobre a propriedade antioxidante de frutas e vegetais, o que fez incrementar, nos últimos 20 anos, as pesquisas nesta área em decorrência da busca de um estilo de vida mais saudável e da constatação de que certos alimentos possuem substâncias biologicamente ativas que trazem benefícios à saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis (HOULIHAN; HO; CHANG, 1985).

Na determinação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos) a posição e o grau de hidroxilação são de extrema importância. Para os flavonóides a *o*-dihidroxilação do anel-B contribui para a atividade antioxidante (SHAHIDI; NACZK, 1985). A estrutura *p*-quinol do anel-B tem sido demonstrada por conferir uma maior atividade que *o*-quinol, entretanto, hidroxilação nas posições *para* e *meta* do anel-B não ocorrem naturalmente. Todos os flavonóides com configuração 3', 4'-hidroxi apresentam atividade antioxidante. Com relação aos ácidos fenólicos, os ácidos cinâmicos hidroxilados são mais efetivos que o ácido benzóico equivalente (DZIEDZIC; HUDSON, 1983).

Os compostos fenólicos de maçãs, como os derivados do ácido hidroxicinâmico, flavonóis e antocianinas, compostos com alto poder antioxidante (LU; FOO, 2000), conhecidos como antioxidantes primários atuam como aceptores de radicais livres e quelantes de íons metálicos (PRATT; HUDSON, 1990).

Dentro da classe dos flavonóides, a mirecetina contém um grupo hidroxila adicional na sua posição 5', que leva a um aumento na atividade antioxidante, quando comparado com a quercetina, que não contém este grupo (SHAHIDI; NACZK, 1985). Segundo Dziedzic e Hudson (1983) um importante fator para o desenvolvimento da atividade nos flavonóides inclui um grupo carbonila na posição 4 e um grupo hidroxila livre na posição 3 e/ou 5; já Pratt e Hudson (1990), demonstraram que o principal atributo para a atividade antioxidante neste grupo de compostos fenólicos é a hidroxilação do anel-B.

Outro grupo da classe dos flavonóides, as chalconas, precursores naturais de flavonas e flavanonas, facilmente ciclizadas em pH ácido, apresentam um potencial antioxidante elevado (SHAHIDI; NACZK, 1985).

O grau de hidroxilação afeta diretamente a atividade de um composto, por exemplo, moléculas agliconas de quercetina e miricetina apresentam-se mais ativas que seus análogos glicosídeos (HOPIA; HEINONEN, 1999).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as maçãs cultivadas no Brasil, bem como seus produtos, com relação ao teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Determinar* o teor de fenóis totais e atividade antioxidante em diferentes cultivares de maçãs, na fruta inteira e em suas partes (epicarpo, mesocarpo e endocarpo).
- *Estabelecer* uma classificação das maçãs cultivadas no Brasil com relação à atividade antioxidante.
- *Correlacionar* os compostos fenólicos e a atividade antioxidante.
- *Estabelecer* o perfil fenólico das cultivares Gala, Fuji e Golden delicious.
- *Avaliar* a influência da intensidade de pigmentação vermelha de maçãs nos teores de compostos fenólicos e na atividade antioxidante.
- *Examinar* o efeito de diferentes operações unitárias utilizadas no processamento de suco de maçã (néctar, clarificado e concentrado) no teor de compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante.
- *Determinar* o poder antioxidante e a perda de fenóis totais no processamento de fermentados de maçã.
- *Determinar* o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em farinha de bagaço de maçãs de diferentes cultivares.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Neste trabalho foram utilizadas amostras de 5 kg de 34 diferentes cultivares de maçãs coletadas em pomares da Região Sul do Brasil, fornecidas por produtores, pela Empresa Agropecuária Catarinense de Santa Catarina (Epagri/SC) e pela Agrícola Fraiburgo (SC) durante as safras de 2005/2006 e 2006/2007 além de amostras adquiridas no comércio local da cidade de Ponta Grossa/PR. Os reativos utilizados foram *pro analysis* e os equipamentos e materiais foram fornecidos pelos Laboratórios de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa e pela *Station de Recherche Cidricole* (Estação de Pesquisa Sidrícola) do Instituto Nacional de Pesquisa Agronômica (INRA) da França.

4.2 MÉTODOS

As metodologias utilizadas no decorrer deste trabalho englobam os processamentos utilizados durante a inibição do escurecimento enzimático, análise das frutas, obtenção de sucos, fermentados e farinha de bagaço de maçãs, além de análises físico-químicas.

4.2.1 Processamentos

4.2.1.1 Inibição do escurecimento enzimático

Para impedir o escurecimento enzimático foram testados três compostos químicos: 1) ácido ascórbico (317999 - NUCLEAR), concentração de 342,4 mg.kg⁻¹; 2) metabissulfito de potássio (M1005.01.AG - Synth), concentração de 250 mg.kg⁻¹ e 3) L-cisteína monoclóhidratada (C-7880- SIGMA), em diferentes concentrações (0,4; 0,6; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mM).

4.2.1.2 Preparo do extrato alcoólico para análise das frutas

No Grupo 1 foram avaliadas maçãs inteiras e no Grupo 2 as partes (epicarpo, mesocarpo e endocarpo). O procedimento para a obtenção do extrato alcoólico foi o mesmo para os dois grupos.

Após a amostragem de forma aleatória com separação de 1 kg de frutas, as mesmas passaram por um processo de seleção que englobou a retirada de maçãs com pontos pretos ou danos mecânicos, provenientes de batidas e, na sequência, foram lavadas em água corrente e pesadas.

De acordo com a Figura 9, após a seleção, as frutas inteiras foram trituradas em processador de alimentos (METVISA – MPA) e a massa ralada foi recolhida em béquero com inibidor do escurecimento enzimático na concentração adequada, homogeneizada e colocada em contato com uma solução extratora composta de álcool 70°: água: ácido fórmico 3 % (80:20:1) na proporção de 1:1 (p/v), conforme metodologia descrita por McGhie, Hunt e Barnett (2005) com algumas modificações, seguida de trituração em mixer vertical (Black & Decker – SB40). Para as amostras do Grupo 2, o processo de extração dos fenóis foi semelhante ao do Grupo 1, porém, antes da trituração, as mesmas foram descascadas de forma manual e o endocarpo (centro) foi retirado com um descaroçador (2 cm), restando o mesocarpo (polpa), em seguida cada uma das três partes foram trituradas em separado. Todas as amostras foram mantidas a -16°C durante 18-24 h e, em seguida, centrifugadas (CELM – COMBATE – Série 3548) por 20 minutos a 3400 rpm e o sobrenadante (extrato alcoólico) foi separado para as análises.

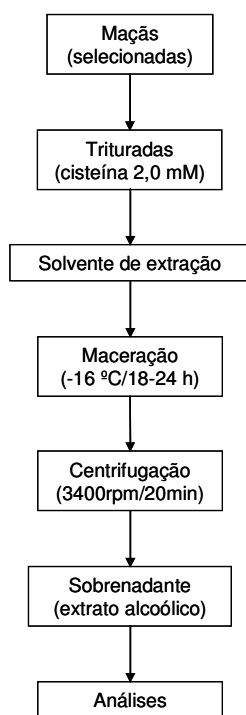


Figura 9: Fluxograma de obtenção dos extratos alcoólicos para análise das frutas (inteira e partes)

4.2.1.3 Processamento dos sucos

Três processamentos foram utilizados nesse trabalho. O primeiro, chamado de ‘suco instantâneo’, foi utilizado como padrão para avaliação da efetividade da L-cisteína na inibição do escurecimento enzimático (Figura 10).

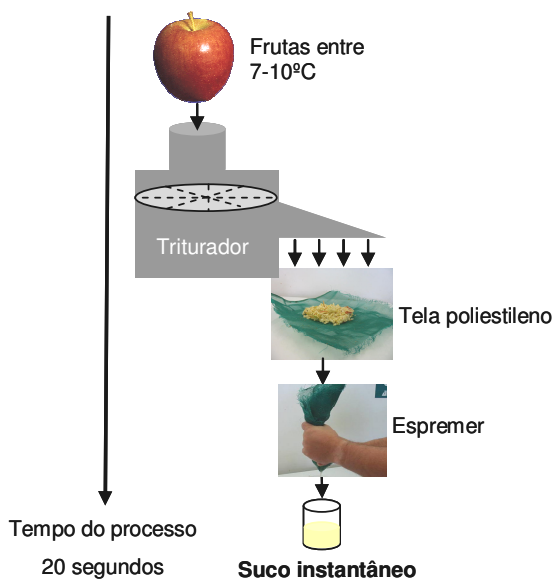


Figura 10 - Fluxograma de obtenção de suco instantâneo

O segundo foi utilizado para verificar o efeito das operações unitárias durante o processamento de suco de maçãs no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante (Figura 11). Amostras de 15 kg das cultivares Gala, Fuji e Golden delicious foram utilizadas para este processo, feito de forma a produzir três tipos de sucos de maçã: bruto, clarificado e concentrado, os quais foram ou não pasteurizados.

Os processos de obtenção dos sucos ocorreram na presença e ausência de inibidor do escurecimento enzimático. O suco bruto, turvo ou néctar engloba apenas as etapas de moagem e prensagem. O suco clarificado, após as etapas de extração (trituração e prensagem) foi despectinizado (Pectinex 3 mL.hL⁻¹, Novozymes do Brasil) à 45°C durante 2 h, filtrado, clarificado com gelatina (VETEC – 3 g.hL⁻¹) e bentonite (40 g.hL⁻¹), seguido de filtração em papel filtro qualitativo. Para a crioc concentração, o suco foi despectinizado e colocado em formas e condicionado a -20 °C durante 12 h, em seguida o suco congelado foi centrifugado (Centrifuga Arno) a 1800 rpm durante 5 minutos, esse processo foi repetido até o suco alcançar 50 °Brix, aproximadamente. Na etapa de pasteurização foi utilizado 80 °C durante 20 minutos.

As perdas pelo escurecimento enzimático foram analisadas em sucos mantidos por vinte minutos sob oxigenação (agitação com uso de barra magnética, em contato com oxigênio atmosférico).

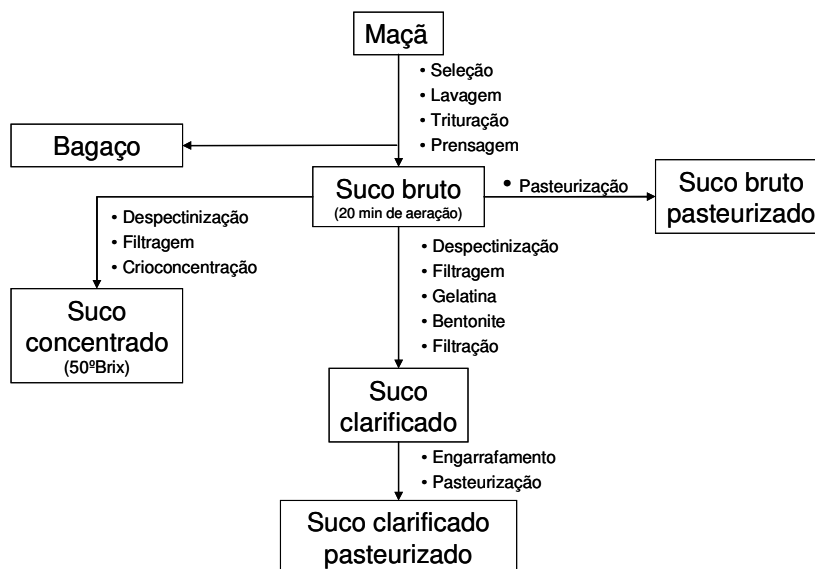


Figura 11 - Fluxograma de obtenção de sucos de maçãs

O terceiro demonstra a obtenção de sucos oxidados (OX) e não oxidados (NOX), processados com a finalidade de verificar os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante em maçãs com diferentes intensidades de pigmentação vermelha (Figura 12).

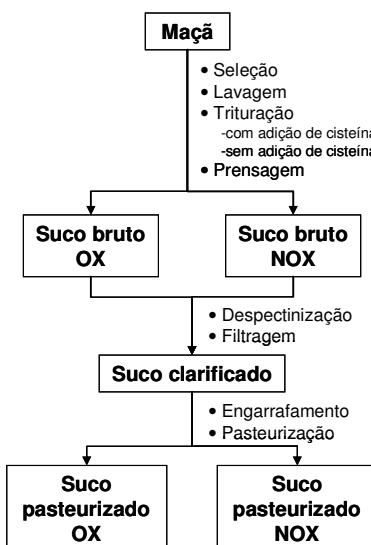


Figura 12 - Fluxograma de obtenção de sucos de maçãs na presença e ausência de inibidor do escurecimento enzimático

4.2.1.4 Processamento de fermentado

Amostras de 15 kg das cultivares Gala, Fuji e Joaquina foram utilizadas neste experimento. O suco foi processado até a etapa de despectinização e filtração. Em seguida, foi transferido para fermentadores esterilizados de 500 mL com batoque, para evitar contaminação com oxigênio durante a fermentação. A levedura comercial seca ativa *Saccharomyces cerevisiae* (Uvaferm CK - Danstar Ferment GAC, Denmark) foi inoculada na população de $2,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹. O processo fermentativo foi monitorado por contagem de leveduras vivas em câmara de Neubauer (XB-K-25, SMIC, China) (LEE et al., 1981) e as análises de fenóis e atividade antioxidante foram feitas durante o processamento do suco e em diferentes fases do crescimento da levedura até exaustão dos açúcares fermentescíveis.

4.2.1.5 Obtenção da farinha de bagaço de maçã

A Figura 13 esquematiza o processo de obtenção de farinha de bagaço de maçã em laboratório, de acordo com Schemin (2003). As maçãs foram lavadas e trituradas em processador de alimentos (METVISA – MPA) para obtenção da massa ralada, que foi prensada (3 kgf.cm^2 durante 10 segundos), originando como subproduto o bagaço. Na sequência, este bagaço foi lavado em água corrente (esgotamento), para eliminar o açúcar residual superficial, com agitação constante e posterior centrifugação (Centrífuga Consul). O material foi desidratado, a 60 °C, em estufa de secagem com circulação de ar (Marconi – MA-035) até peso constante (umidade entre 4 e 8 g.100g⁻¹). O produto seco foi homogeneizado em moinho de facas (Tec Mill TE-633, Tecnal) e posteriormente tamisado através de um agitador de peneiras magnético (Bertel) em velocidade máxima, por 30 minutos, obtendo a farinha de bagaço de maçã com 60 *mesh*.

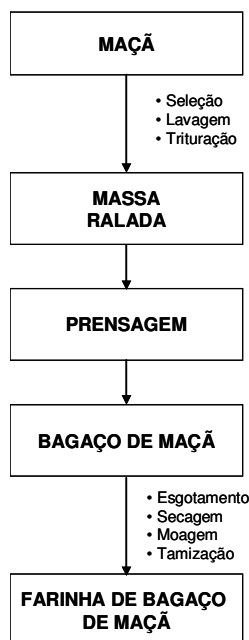


Figura 13 - Fluxograma de obtenção da farinha de bagaço de maçã

4.2.2 Análises físico-químicas

4.2.2.1 Determinação de compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado pela análise colorimétrica de Folin-Ciocalteu descrita por Singleton e Rossi (1965). Os fenóis reduzem a mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, encontrado no reativo de Folin-Ciocalteu, em óxidos de tungstênio e molibdênio de cor azul, a qual exibe uma absorção de luz em um comprimento de onda máximo de 765 nm. Uma solução contendo os reativos da análise e o inibidor enzimático foi utilizada como branco. Os resultados foram expressos em mg.L^{-1} ou mg.kg^{-1} de fenólicos totais, utilizando catequina (SIGMA – C-1251) como padrão ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

4.2.2.2 Determinação da atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante foi utilizada a metodologia de FRAP, (poder antioxidante pela redução do ferro) descrita por Benzie e Strain (1996) e Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000). O reagente de FRAP foi preparado na concentração de 10:1:1 com as seguintes soluções: **(a)** tampão acetato de sódio (Dinâmica) 300 mM a pH 3,6; **(b)** solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazine (TPTZ – Flucka Chemicals Suisse) 10 mM em ácido clorídrico (VETEC – Cód. 154) 40 mM e **(c)** solução de cloreto férrico (Synth – Cód. 32289) 20 mM.

Este reagente foi preparado no momento da análise. Como padrão foi utilizado o reativo ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (TROLOX – Flucka Chemicals Suisse – Cód. 56510) em concentração de 500 μM a 1000 μM .

A leitura da absorbância foi feita em 593 nm, utilizando o reagente FRAP para zerar o espectrofotômetro (L1). As leituras foram monitoradas durante 6 minutos (L6) a cada 15 segundos. A variação de absorbância entre L6 e L1 foi calculada para cada amostra, sendo traduzida em um valor de FRAP por proporcionalidade com a da solução padrão testada em paralelo. O resultado foi expresso como μmol de redução de ferro/poder antioxidante (valor de FRAP) por grama de amostra. Uma solução contendo os reativos da análise e o inibidor enzimático foi utilizada como branco.

4.2.2.3 Determinação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

Para esta análise as amostras foram liofilizadas (Liofilizador de bancada LC 1500) no Laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassa do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e encaminhadas ao *Institute National de la Recherche Agronomique* (França) aos laboratórios da Estação Sidrícola (LeRheu) para análise em aparelho de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) constituído de um sistema de bombas (WatersTm 600 controller), injetor automático (WatersTm 717 autosampler) e de um detector em diodo (WatersTm 996 photodiode array detector). A coluna utilizada foi a *LiChroCART® 250-4 HPLC-Cartridge*, com a fase tipo *Purospher® RP-18 end-capped (5 μm)*; sendo o conjunto coluna/fase fornecido por *Merck KgaA*, Alemanha. Os resultados foram tratados com o programa *Millenium®*³².

Tabela 3 - Condições de análise cromatográfica – gradiente aplicado

Tempo (min.)	Ac. Acético 2,5%	Acetonitrila	Forma do gradiente
0	97	3	Linear
5	91	9	Linear
15	84	16	Linear
45	50	50	Linear
48	10	90	Linear
51	10	90	Linear
55	97	3	Linear

Fonte: GUYOT et al., 2001.

As condições de análise cromatográficas (direta ou após tiólise) dos meios reacionais foram os seguintes: sistema de eluição binária, solvente A (solução de ácido acético 2,5 %,

Biosolve, ref. 01070501); solvente B (acetonitrila, qualidade gradiente); início: 1 mL por minuto; pressão máxima: 2500 psi; volume de injeção: 10 µL; temperatura da coluna: 30 °C; faixa de detecção: espectro de 200 a 600 nm. E o gradiente aplicado pode ser visualizado na Tabela 3.

- **Identificação dos compostos fenólicos.** Os compostos fenólicos com padrões disponíveis foram analisados mediante seus espectros UV/visível e pelo tempo de retenção dos compostos. Os diferentes picos caracterizados foram então agrupados. Os flavan-3-óis (monômeros e procianidinas) apresentam uma única banda simétrica com uma absorbância máxima de 278 nm, os derivados de ácidos hidroxicinâmicos apresentam o máximo de absorbância entre 300 e 320 nm, flavonóis são caracterizados por uma banda de absorção acima de 340 nm e dihidrochalconas apresentam um pico simétrico a 285 nm (GUYOT et al., 1998; GUYOT et al., 2001).

- **Quantificação dos compostos fenólicos.** A quantificação dos compostos foi realizada em relação à medida da área de integração e a equação de calibração do correspondente padrão sendo os picos correspondentes sobre os cromatogramas a 280 nm para os flavan-3-óis e as dihidrochalconas; a 320 nm para os ácidos hidroxicinâmicos e a 350 nm para os flavanóis.

- **Tiólise.** A metodologia de HPLC em fase reversa, classicamente utilizada na separação e dosagem de compostos fenólicos, não permite diretamente a dosagem de polímeros de flavan-3-óis. A reação de tiólise, específica dos procianidóis, permite essa quantificação sem que os picos sobrepostos acarretem dificuldades na integração ou na dosagem de outros compostos. Essa reação em meio ácido causa a despolimerização dos procianidóis por ruptura das ligações interflavanas, resultando na formação de 4- flavanil-carbocátions a partir de unidades de extensão enquanto que as unidades terminais inferiores são liberadas sob a forma de monômeros de flavan-3-óis (catequina e epicatequina). Os 4- flavanilcarbocátions são imediatamente aprisionados por um reativo nucleofílico, o tolueno- α -thiol, para formar os derivados 4-benzil-tioéter de flavan-3-óis. A reação de tiólise foi conduzida em condições anidra, pois a água a inibe.

- **Protocolo da tiólise sobre amostra liofilizada.** As amostras liofilizadas foram pesadas (50 - 100 mg) em tubos *Eppendorf* (1,5 mL) com posterior adição de metanol acidificado [3,3 % (v/v) em HCl, 400 µL] e solução de tolueno α -tiol (5 % em metanol, 800 µL). Na sequência os tubos foram incubados a 40 °C por 30 minutos, com agitação em vortex a cada 10 minutos. Após, os tubos foram refrigerados em banho de gelo por 5 minutos e, 200

μL da mistura foi imediatamente filtrada através de uma membrana de poli-tetra-fluor-etileno (PTFE) de $0,45\ \mu\text{m}$ e transferidos em um *insert* de injeção, lacrado com tampa de butil-Teflon e estocados a $4\ ^\circ\text{C}$ até a realização da análise.

- ***Extração direta dos compostos fenólicos de amostra liofilizada.*** Quando a tiólise é realizada, a distinção entre os flavonóis monoméricos das unidades terminais das procianidinas e as catequinas nativas, presentes antes do processo de tiólise, não ocorre. Por isso, um solvente extrator foi utilizado para a determinação das catequinas nativas, constituído de metanol acidificado (1 % de ácido acético, v/v). A amostra liofilizada foi diluída nesta solução e extraída por ‘sonication’ por 15 minutos. Em seguida foi filtrada (PTFE, $0,45\ \mu\text{m}$), e a fase líquida foi utilizada para posterior análise.

4.2.2.4 Determinação de antocianinas e flavonóis

O teor de antocianinas e de flavonóis foi determinado pela metodologia descrita por Fuleki e Francis (1968). Após extração das antocianinas e flavonóis com solvente extrator (etanol 95 % e HCl 1,5 N, na proporção de 85:15 v/v) a leitura de absorbância foi feita a 535 nm e 374 nm, respectivamente. O total de antocianinas nas amostras foi expressa em mg.100g^{-1} de cianidina-3-galactosídeo, enquanto o teor de flavonóis em mg.100g^{-1} de quercetina, utilizando massa total da amostra, fator de diluição e o valor médio do coeficiente de absortividade molar para cada um dos compostos analisados.

4.2.2.5 Determinação de açúcares redutores e não-redutores

Esta determinação foi utilizada como um dos parâmetros para avaliação do processo fermentativo e foi analisada pelo método de Somogyi-Nelson, conforme metodologia descrita por Tanner e Brunner (1985), que tem fundamento na oxidação de monossacarídeos redutores através de agentes oxidantes relativamente suaves, como íons férrico (Fe^{+3}) e cúprico (Cu^{+2}), em meio alcalino. O íon cuproso (Cu^{+}), produzido na primeira etapa desta reação, forma o óxido cuproso (precipitado vermelho tijolo) que, na segunda etapa, irá reagir com o arsênio-molibdato, formando o óxido de molibdênio. A intensidade de cor formada foi medida em espectrofotômetro (520 nm) e calculada pela equação linear obtida com auxílio de uma curva padrão de glicose a 1 %.

Na determinação de açúcares redutores totais a amostra foi hidrolisada, com auxílio de ácido clorídrico concentrado na proporção de 1:5 e na presença de aquecimento ($67 - 70\ ^\circ\text{C}$ durante 5 minutos).

4.2.2.6 Determinação de nitrogênio total

Para a dosagem de nitrogênio total nas amostras de fermentados de maçãs, a metodologia de micro-Kjeldahl (JULIEN; TRIOLI; DULAU, 2001) foi utilizada, a qual consiste nas etapas de digestão, destilação e titulação. Durante a digestão, na presença de ácido sulfúrico concentrado, catalisador (mistura de sulfato de cobre e sulfato de potássio, 1:3) e temperatura (350 °C), ocorre uma transformação do nitrogênio em sulfato de amônio. O ponto final da reação é caracterizado quando a amostra apresenta-se incolor ou com coloração verde translúcida. O material digerido foi alcalinizado com hidróxido de sódio 50 % sob aquecimento, o que libera amônia, carregada, com auxílio de vapor d'água, e posteriormente recolhida em solução de ácido bórico 3 % na presença de indicadores (vermelho de metila e verde de bromocresol, ambos a 1 % em etanol, na proporção de 1:5). Após a amônia ser recolhida em ácido bórico, o nitrogênio foi determinado por titulação direta com ácido clorídrico 0,01 N. A amostra, foi desidratada a 60 °C antes do processo de digestão.

4.2.2.7 Determinação de acidez total e volátil

A determinação da acidez total consiste na neutralização dos ácidos tituláveis, com solução de hidróxido de sódio de normalidade conhecida (0,1N), utilizando fenolftaleína 1 % como indicador. Na determinação da acidez volátil quantificam-se os ácidos que se desprendem do fermentado de maçã por destilação, representado, quase que exclusivamente, pelo ácido acético. Após esta separação, os ácidos foram titulados conforme descrito para a acidez total.

4.2.2.8 Determinação do grau alcoólico

A ebulliometria foi a metodologia utilizada para se determinar o grau alcoólico onde o teor de álcool, em volume, corresponde ao número de litros de etanol contidos em 100 mL de amostra. A diferença da temperatura de ebulição entre a água e o fermentado de maçã, nas mesmas condições, permite calcular o grau alcoólico da amostra.

4.2.2.9 Análises estatísticas

As análises foram feitas em triplicatas e avaliadas mediante a análise de variância (ANOVA) e diferenciação das médias por teste de Tukey, em nível de 5 %, pelo programa Microsoft Office Excel 2003, com o intuito de verificar e identificar diferenças significativas entre as amostras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO INIBIDOR DO ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO

Para análise dos compostos fenólicos e do poder antioxidante das frutas e seus produtos, foi necessário avaliar a eficiência do inibidor do escurecimento enzimático e sua interação com outros reagentes químicos a fim de evitar perdas destes compostos por oxidação e interferências nos resultados por interação com os reativos específicos de cada metodologia. Desta forma, foram testados três inibidores enzimáticos: [1] ácido ascórbico, [2] metabissulfito de potássio e [3] L-cisteína.

Os inibidores ácido ascórbico e metabissulfito de potássio apresentaram intensa reação com os reativos de Folin e com a solução de FRAP (dados não apresentados), prejudicando os resultados da análise.

Na avaliação da L-cisteína como inibidor da oxidação, foi constatado que, além de impedir esta reação (Figura 14), este aminoácido, em baixas concentrações (0,4 a 2,0 mM), quando em contato com a solução de FRAP, reagiu pouco, quando comparado às maiores concentrações (Figura 15), podendo ser corrigido o valor de absorbância da amostra com uma solução contendo a L-cisteína e o reativo da análise (branco).

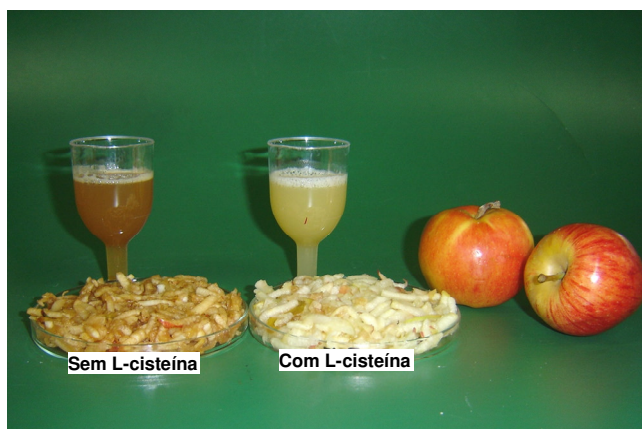


Figura 14 - Suco e triturado de maçã na presença e ausência de L-cisteína

Na Tabela 4 pode ser observado o efeito de diferentes concentrações de L-cisteína nas análises de atividade antioxidante e fenóis totais. Quando a extração do suco ocorreu de forma instantânea (Figura 9) o valor para a atividade antioxidante foi de $5981 \mu\text{M} \cdot \text{mL}^{-1}$ e para os

fenóis totais de 771 mg.L^{-1} . No mesmo suco, após trinta minutos de oxidação enzimática, os valores diminuíram para $1392 \text{ } \mu\text{M.mL}^{-1}$ e 294 mg.L^{-1} , respectivamente, indicando perdas importantes com essa reação.

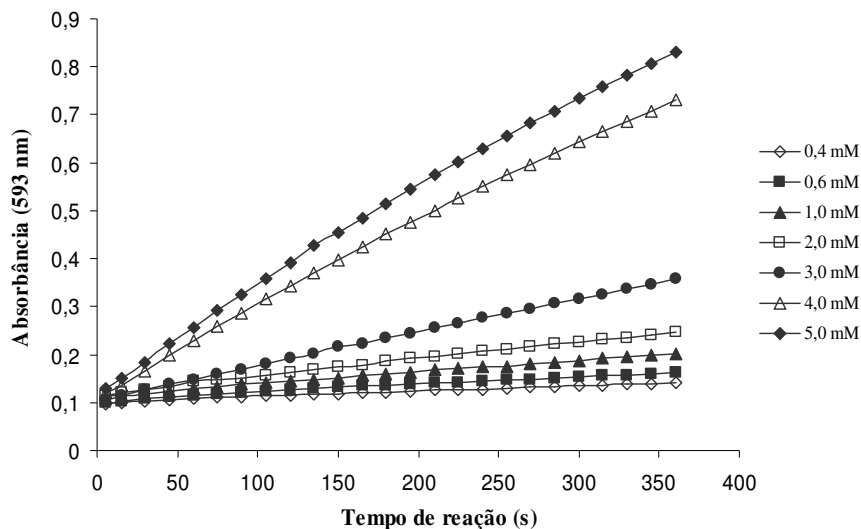


Figura 15 - Reação de diferentes concentrações de L-cisteína com reativo FRAP

Com o aumento da concentração de L-cisteína foi possível perceber que os teores de fenóis totais e a atividade antioxidante da amostra aumentaram; o que comprova a ação da L-cisteína como agente inibidor do escurecimento enzimático (Tabela 4).

Em relação à atividade antioxidante, pode ser observado na Tabela 4, que a concentração de 3,0 mM de L-cisteína seria a ideal para os experimentos, pois foi a que apresentou um maior valor para esta análise, $17117 \text{ } \mu\text{M.mL}^{-1}$, diferindo estatisticamente dos demais. Porém, nesta concentração, os valores de absorbância para os brancos foram de 0,271 para análise de atividade antioxidante e de 0,118 para os fenóis totais, os quais foram considerados elevados. A concentração de 2,0 mM de L-cisteína apresentou efeito semelhante no bloqueio da reação de escurecimento enzimático, e os teores de fenóis totais alcançaram o maior valor (1617 mg.L^{-1}), em maiores concentrações deste aminoácido os teores de fenóis totais foram menores (Tabela 4).

O aumento significativo da atividade antioxidante e dos fenóis totais está certamente associado com o aumento da concentração de L-cisteína. Segundo Richard-Forget, Goupy e Nicolas (1992) isto pode ser atribuído pelo fato de que em baixas concentrações deste inibidor, as o-quinonas formadas durante o escurecimento enzimático podem co-oxidar, formando o composto L-cisteína-quinona, que pode regenerar o fenol com desenvolvimento de coloração intensa. Em altas concentrações, os produtos formados pela associação entre a L-

cisteína e as o-quinonas podem agir como um inibidor da reação de escurecimento enzimático (JANOVITZ-KLAPP et al., 1990).

Tabela 4 - Efeito de diferentes concentrações de L-cisteína nas análises de atividade antioxidante e de fenóis totais

Concentração de cisteína, mM	Abs. FRAP	Atividade Antioxidante, $\mu\text{M.mL}^{-1}$	Abs. Fenóis	Fenóis Totais, mg.L^{-1}
0*	---	5981 ^e	---	771 ^e
0**	---	1392 ^f	---	294 ^g
0,5	0,066	5715 ^e	0,020	487 ^f
1,0	0,110	7018 ^d	0,043	1062 ^d
1,5	0,127	11521 ^c	0,061	1333 ^b
2,0	0,155	13656 ^b	0,080	1617 ^a
3,0	0,271	17117 ^a	0,118	1196 ^{bc}
4,0	0,644	11903 ^c	0,156	1216 ^{bc}
5,0	0,745	13048 ^b	0,172	1285 ^b

Nota: (Abs.) absorvância da solução de L-cisteína com os reativos específicos da análise de FRAP e fenóis totais. *Suco instantâneo (sem oxidação); **Suco oxidado (30 min)

Desta forma, a concentração final de L-cisteína, que apresentou maior eficiência na inibição do escurecimento enzimático, com pouca interferência nos reativos das análises e que facilmente foram corrigidas com os respectivos brancos, foi 2,0 mM.

5.2 PADRONIZAÇÃO DA ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (FRAP)

A análise de atividade antioxidante nas amostras de maçãs foi determinada pela metodologia de FRAP, utilizando o poder de redução do íon ferro como uma medida do ‘poder antioxidante’ da amostra. Esta metodologia foi a de escolha por sua simplicidade na realização, por fornecer resultados rápidos e ser de baixo custo. Além disso, de acordo com Benzie e Strain (1996) e com Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000) sua reação é reprodutível e linearmente relacionada com a concentração molar do antioxidante presente na forma pura ou de mistura. Pode, também, ser aplicada para avaliar a atividade antioxidante do plasma ou em extratos de alimentos e bebidas (BENZIE; STRAIN, 1999; BENZIE; SZETO, 1999).

Tsao et al. (2005) determinaram a atividade antioxidante em oito cultivares de maçãs através de três metodologias: a) poder antioxidante/redutor do ferro (FRAP); b) sistema modelo β -caroteno-ácido linoléico (β -CLAMS) e a análise de foto-químio-luminescência (PCL). Entre as três metodologias testadas a análise de FRAP e PCL foram mais quantitativas que β -CLAMS. Apesar do método PCL ser mais sensível que os outros dois, detectando os antioxidantes em nanomoles, ele não pode prever/refletir a atividade de certos grupos fenólicos, como o dos flavan-3-óis, classe com alta atividade antioxidante (VAN DER SLUIS et al., 2002; VAN DER SLUIS; DEKKER; JONGEN, 2003). A análise de β -CLAMS promove uma “quantificação arbitrária”, segundo Tsao et al. (2005), devido ao tempo de análise que pode variar 15 a 300 minutos, dependendo da amostra (SHIH; DAIGLE, 2003; BIRCH et al., 2001), o que pode acarretar diferentes conclusões.

Segundo Benzie e Strain (1996) e Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000) a determinação da habilidade de redução do ferro de alguns antioxidantes, como o ácido ascórbico e o TROLOX, utilizados como padrões no método original, se dá em quatro minutos. Quando estas condições foram aplicadas nesse trabalho, foi observado que em um intervalo de tempo de quatro minutos a redução do complexo formado pelo ferro e o TPTZ (Fe^{+2} -TPTZ) continuava; o que pôde ser claramente acompanhado pela variação de absorbância. Portanto, uma extrapolação no tempo de análise para seis minutos foi necessária para otimização da reação. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) utiliza banho-maria à temperatura de 37 °C e, nesse trabalho, convencionou-se o uso de temperatura ambiente (22 – 25 °C), o que pode ter tornado a reação mais lenta.

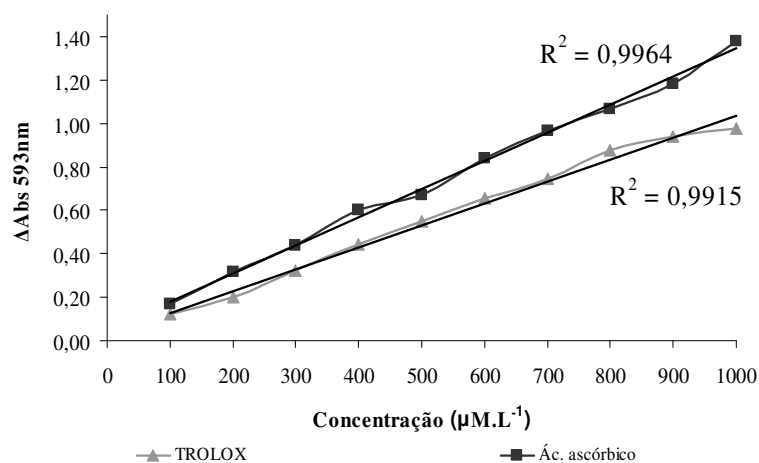


Figura 16 - Curva de concentração resposta para soluções padrões de TROLOX e ácido ascórbico

De acordo com a Figura 16, os padrões de ácido ascórbico e TROLOX utilizados nesse trabalho, demonstraram uma relação dose-resposta linear, independente da concentração utilizada, demonstrando uma equação de regressão similar. Como o ácido ascórbico reage de forma intensa com os reativos das análises de FRAP e fenóis totais, o TROLOX foi o padrão de escolha, somado à absorvância constante após os seis minutos da análise.

5.3 AVALIAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM MAÇÃS

As cultivares de maçãs possuem um conteúdo de fenóis totais que podem variar entre 1.000 e 6.000 mg.kg⁻¹ de fruta fresca, sendo que algumas cultivares podem alcançar teores mais elevados, chegando a valores próximos de 10.000 mg.kg⁻¹ (GORINSTEIN et al., 2001; PODSEDEK et al., 2000; SANONER et al., 1999). Nesse trabalho, as quantidades de fenóis oscilaram entre 456 e 1583 mg.kg⁻¹, em média (Tabela 5), nas 65 amostras analisadas, pertencentes às safras 2005/2006 e 2006/2007. Um alto conteúdo foi observado para a cultivar Daiane (2206 mg.kg⁻¹) em comparação com as cultivares de produção mais expressivas no Brasil: (a) Gala, com teores de 1051 mg.kg⁻¹ e (b) Fuji, com teores de 1183 mg.kg⁻¹, em média. Os baixos valores encontrados para as frutas cultivadas no Brasil em relação às outras citadas na literatura internacional são devido à seleção das cultivares com baixa adstringência em resposta a preferência dos consumidores, uma vez que são maçãs exclusivamente para consumo *in natura*.

Na Tabela 5 pode ser observado que a cultivar experimental M-2/01 foi a que apresentou um maior valor de coeficiente de variação (55,08 %), seguida da cultivar Gala (PR), onde o coeficiente de variação foi 52,36 % e da cultivar Daiane de 51,08 %. Estes altos coeficientes podem ser justificados pela variação existente entre as amostras analisadas, concordando com estudos de McGuie, Hunt e Barnett (2005). Estas variações podem ser provenientes de fatores como região de plantio (LATTANZIO et al., 2001), safra e estação da colheita (LEA; ARNOLD, 1978; LATTANZIO et al., 2001; VAN DER SLUIS et al., 2001).

Os teores de fenóis totais para a cultivar M-2/01, para as duas amostras analisadas, obtiveram valores médios de 381 e 1408 mg.100g⁻¹. Para a cultivar Gala (PR) duas amostras foram analisadas, sendo uma proveniente da Cidade de Porto Amazonas, com conteúdo de polifenóis totais médios de 595 mg.kg⁻¹, enquanto a amostra produzida na Cidade da Lapa teve seus teores praticamente dobrados (1337 mg.kg⁻¹). Na cultivar Daiane estes teores oscilaram entre 929 e 2206 mg.kg⁻¹, sendo que para esta cultivar, três amostras foram analisadas, duas pertencentes à safra 2005/2006 e uma à 2006/2007, sendo cultivadas no Estado de Santa Catarina (Caçador e Água Doce).

Porém algumas cultivares não apresentaram diferenças entre o teor de fenóis com relação à safra e a região; por exemplo, a cultivar Royal Gala produzida no Paraná com a mesma cultivar produzida em Santa Catarina.

Tabela 5 - Estatística descritiva para análise de fenóis totais (mg.kg⁻¹)

Origem	Cultivares	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
SC	Akifu	3	930	935	933	3	0,27
SC	Braeburne	3	665	805	726	72	9,90
PR	Carícia	3	1550	1631	1583	43	2,69
SC	Catarina	6	1323	1465	1391	71	5,09
SC	Cherry Gala	3	926	1008	965	41	4,26
SC	Condessa	3	596	608	602	6	1,00
SC	Daiane	9	929	2206	1382	714	51,68
SC	Duquesa	3	760	808	792	28	3,50
PR	Eva	3	885	1070	968	94	9,71
SC	Eva	6	576	618	598	21	3,51
SC	Fuji	12	1063	1281	1183	111	9,37
SC	Fuji suprema	3	1243	1293	1267	25	1,96
SC	Gala colorida	3	1105	1129	1118	12	1,06
PR	Gala	6	548	1337	834	437	52,36
RS	Gala	3	1218	1274	1245	28	2,25
SC	Gala	15	806	1269	1074	240	22,35
SC	Golden delicious	9	911	1297	1055	211	19,96
Arg	Granny Smith	3	1106	1168	1147	36	3,12
SC	Iapar 180	3	450	462	456	6	1,32
RS	Imperatriz	3	1264	1336	1298	36	2,81
SC	Imperial Gala	3	1093	1139	1123	26	2,31
SC	Joaquina	9	958	2049	1368	594	43,42
SC	M-11/00	9	750	1012	888	132	14,83
SC	M-11/01	3	723	762	736	22	3,00
SC	M-12/00	6	545	695	637	80	12,57
SC	M-13/00	6	519	680	594	81	13,69
SC	M-13/91	9	903	1087	985	94	9,50
SC	M-2/01	6	381	1408	1043	574	55,08
SC	M-6/00	6	569	745	636	95	14,98
SC	M-8/01	3	1328	1400	1352	42	3,08
RS	Mollies	3	1399	1447	1430	27	1,87
SC	Mollies	3	1115	1128	1121	7	0,61
SC	MRC-11/95	6	1035	1214	1133	91	8,00
SC	P-23	3	1027	1060	1046	17	1,60
PR	Princesa	3	794	820	811	14	1,78
Arg	Red delicious	3	1162	1334	1245	86	6,93
PR	Royal Gala	6	1096	1212	1144	60	5,26
SC	Royal Gala	3	1096	1116	1107	10	0,91
SC	Sansa	3	1090	1129	1109	19	1,74

A atividade antioxidante demonstrou valores que variaram de 5606 a 23719 $\mu\text{M.g}^{-1}$ (Tabela 6). De acordo com McGuie, Hunt e Barnett (2005) a diferença encontrada no valor de atividade antioxidante para as amostras analisadas pode ser explicada, não somente pela concentração de fenóis totais que variaram entre as cultivares de maçãs, mas também pela variação que ocorre nos compostos fenólicos individuais.

Tabela 6 - Estatística descritiva da análise de atividade antioxidante ($\mu\text{M.g}^{-1}$)

Origem	Cultivares	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
SC	Akifu	3	13875	14656	14251	391	2,74
SC	Braeburne	3	13545	14049	13794	252	1,83
PR	Carícia	3	23609	23880	23719	142	0,60
SC	Catarina	6	17658	20615	19113	1479	7,74
SC	Cherry Gala	3	14524	15426	14894	472	3,17
SC	Condessa	3	11036	11948	11431	468	4,09
SC	Daiane	3	12112	18509	14478	3509	24,24
SC	Duquesa	3	13472	14488	13850	556	4,01
PR	Eva	3	10491	20444	17083	5709	33,42
SC	Eva	6	8326	9222	8811	453	5,14
SC	Fuji	12	11111	14019	12957	1604	12,38
SC	Fuji suprema	3	16423	20108	18844	2097	11,13
SC	Gala colorida	3	17192	18385	17807	597	3,35
PR	Gala	6	6938	17692	10572	6167	58,33
RS	Gala	3	16832	17010	17257	369	2,14
SC	Gala	15	13010	17010	14775	2018	13,66
SC	Golden delicious	9	12131	21485	16445	4719	28,69
Arg	Granny Smith	3	14352	15216	14835	441	2,97
SC	Iapar 180	3	6866	7440	7157	287	4,01
RS	Imperatriz	3	20867	21247	21102	205	0,97
SC	Imperial Gala	3	18753	14722	18907	1416	7,49
SC	Joaquina	9	11016	16585	13117	3026	23,07
SC	M-11/00	9	11016	16585	13117	3026	23,07
SC	M-11/01	3	8453	8547	8491	50	0,59
SC	M-12/00	6	5662	11342	9310	3166	34,01
SC	M-13/00	6	3397	7935	5606	2271	40,51
SC	M-13/91	9	11288	17499	15259	3448	22,60
SC	M-2/01	6	14827	15229	15024	201	1,34
SC	M-6/00	6	8450	11599	10335	1664	16,10
SC	M-8/01	3	13805	14542	14073	408	2,90
RS	Mollies	3	17041	18255	17814	672	3,77
SC	Mollies	3	21680	22114	21906	217	0,99
SC	MRC-11/95	6	12699	14562	13622	932	6,84
SC	P-23	3	15718	15978	15848	130	0,82
PR	Princesa	3	14922	15896	15496	510	3,29
Arg	Red delicious	3	16456	17126	16739	347	2,07
PR	Royal Gala	6	13365	14201	13755	347	2,52
SC	Royal Gala	3	14988	16228	15635	622	3,98
SC	Sansa	3	15935	18049	16874	1076	6,38

As amostras originárias da Argentina, Red delicious e Granny Smith, apresentaram valores médios de atividade antioxidante de 16739 e de 14835 $\mu\text{M.g}^{-1}$ de amostra, respectivamente (Tabela 6). A capacidade antioxidante na cultivar Red delicious também foi analisada por Tsao et al. (2005), obtendo-se resultado semelhante, 17851 $\mu\text{M.g}^{-1}$.

Na Tabela 6 é possível observar que o maior coeficiente de variação, 58,33 %, foi atribuído a amostra Gala (PR), com valores de atividade antioxidante variando de 6987 a 17692 $\mu\text{M.g}^{-1}$.

5.3.1 Classificação das maçãs de acordo com a atividade antioxidante

A Tabela 7 demonstra o teor de atividade antioxidante de várias cultivares de maçãs brasileiras, incluindo duas cultivares produzidas na Argentina. As 63 amostras de maçãs cultivadas no Brasil, safras 2005/2006 e 2006/2007, analisadas nesse trabalho, foram agrupadas conforme cultivar e região de cultivo para se estabelecer uma classificação de atividade antioxidante (Figura 17).

As maçãs cultivadas no Brasil foram divididas em três grupos de acordo com Lee e Smith (2000): grupo com **alta atividade antioxidante**, com valores iguais ou maiores que 60 %; grupo com **média atividade**, valores entre 41 e 59 %, e grupo com **baixa atividade**, valores iguais ou menores que 40 %. Os resultados foram expressos como porcentagem relativa, referentes a cultivar com maior atividade antioxidante, 'Carícia' (Tabela 7).

As cultivares Red delicious, com atividade antioxidante média de 16739 $\mu\text{M.g}^{-1}$ e a cultivar Granny Smith com valores médios de 14835 $\mu\text{M.g}^{-1}$, cultivadas na Argentina e comercializadas no Brasil, podem ser classificadas no grupo com alta atividade antioxidante, com porcentagens equivalentes a 71 % e 63 %, respectivamente.

De acordo com a classificação acima, 21 amostras apresentaram altos teores de atividade antioxidante, enquanto apenas cinco foram classificadas no grupo com baixa atividade. Contrapondo o trabalho de Lee e Smith (2000), onde das 24 amostras analisadas, todas cultivadas em Nova Iorque, somente oito foram classificadas com alta atividade e dez foram agrupadas com baixa.

Tabela 7 – Classificação das cultivares de maçãs em função da atividade antioxidante

Origem	Cultivar	AAT ($\mu\text{M.g}^{-1}$)	Classificação (%)	Atividade
PR	Carícia	23719	100	Alta
SC	Mollies	21906	92	
RS	Imperatriz	21102	89	
SC	Catarina	19113	81	
SC	Imperial Gala	18907	80	
SC	Fuji suprema	18844	79	
RS	Mollies	17814	75	
SC	Gala colorida	17807	75	
RS	Gala	17257	73	
PR	Eva	17083	72	
SC	Sansa	16874	71	
SC	Golden delicious	16445	69	
SC	P-23	15848	67	
SC	Royal Gala	15635	66	
PR	Princesa	15496	65	
SC	M-13/91	15259	64	
SC	M-2/01	15024	63	
SC	Cherry Gala	14894	63	
SC	Gala	14775	62	
SC	Daiane	14478	61	
SC	Akifu	14251	60	
SC	M-8/01	14073	59	Média
SC	Duquesa	13850	58	
SC	Braeburne	13794	58	
PR	Royal Gala	13755	58	
SC	MRC-11/95	13622	57	
SC	Joaquina	13117	55	
SC	M-11/00	13117	55	
SC	Fuji	12957	55	
SC	Condessa	11431	48	
PR	Gala	10572	45	
SC	M-6/00	10335	44	Baixa
SC	M-12/00	9310	39	
SC	Eva	8811	37	
SC	M-11/01	8491	36	
SC	Iapar 180	7157	30	
SC	M-13/00	5606	24	

Dentre as cultivares de maior produção no Brasil, a cultivar Gala, procedente de pomares do Estado do Rio Grande do Sul, foi a que obteve maior destaque com relação ao poder antioxidante, sendo classificada no grupo com alta atividade; seguida das cultivares

Golden delicious e Fuji, que possuem atividade antioxidante mediana. A maçã Gala, cultivada no Estado de Santa Catarina, também ficou enquadrada no grupo de alta atividade antioxidante.

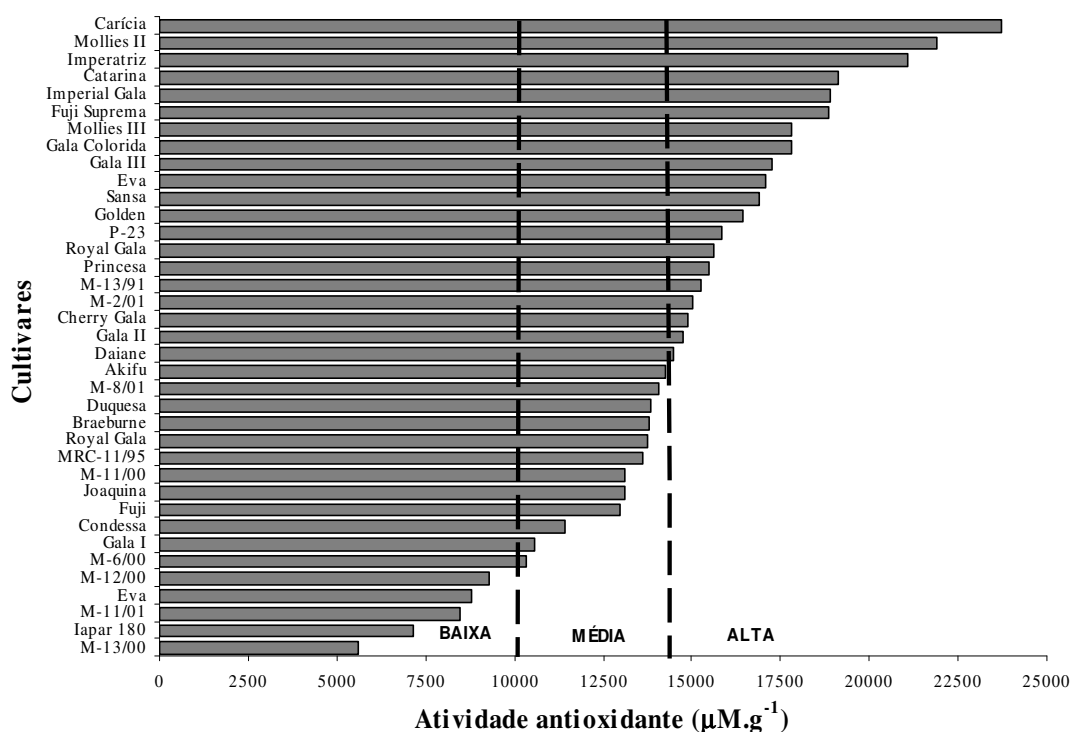


Figura 17 – Classificação de maçãs quanto à atividade antioxidante
Nota: I (PR), II (SC) e III (RS).

O interesse pela cultivar Golden delicious, uma das mais plantadas no mundo (JANICK et al., 1996; MILLER, 1991), vem diminuindo paulatinamente nos últimos anos, com pomares representando menos que 5 % da área plantada hoje no Brasil (EPAGRI, 2002), provavelmente relacionado com seu pequeno índice de aceitação no mercado brasileiro (EPAGRI, 2002), por sua coloração verde-amarelada. Com os resultados obtidos nesse trabalho, a produção desta cultivar no país pode ser retomada, pois a mesma demonstrou, *in vitro*, ter um importante valor funcional quando se trata de atividade antioxidante.

As cultivares de maçãs analisadas apresentaram diferenças significativas no teor de fenóis totais e atividade antioxidante. A cultivar Daiane, com maior teor de fenóis totais, apresentou 5,8 vezes mais polifenóis que a cultivar com menor teor (M-2/01). A atividade antioxidante da cultivar Carícia, primeira classificada (23719 μM.g⁻¹), diferiu significativamente das demais amostras analisadas. Estes resultados indicam que o consumo

de polifenóis antioxidantes de maçãs pode ser aumentado simplesmente através da escolha apropriada da cultivar.

5.3.2 Correlação entre fenóis totais e atividade antioxidante

Freqüentes estudos correlacionam o conteúdo de fenóis totais com a atividade antioxidante (TSAO et al., 2005; SUN et al., 2002; CHINNICI et al., 2004). Nesse trabalho, um modelo de regressão linear foi utilizado para demonstrar a possível correlação entre estes dois parâmetros, o qual não foi altamente significativo ($R^2 = 0,5894$) para as 39 amostras de maçãs analisadas. Sabe-se que as propriedades antioxidantes de compostos fenólicos únicos, dentro de uma classe fenólica, podem variar de forma notável, de maneira que os mesmos níveis destes compostos não correspondam às mesmas respostas antioxidantes (TSAO et al., 2005). Retirando quatro amostras deste grupo, pela baixa correlação entre fenóis totais e atividade antioxidante, o R^2 aumentou para 0,7396 (Figura 18). Isto pode ser devido à variação e distribuição dos compostos nas amostras. Além disso, a metodologia de Folin-Ciocalteu pode quantificar, além de flavonóides antioxidantes, outros compostos fenólicos que não tenham a mesma atividade.

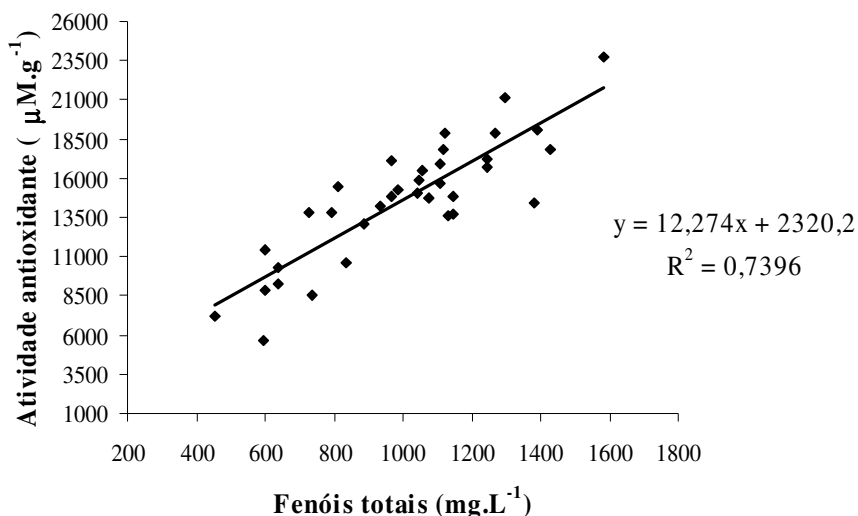


Figura 18 – Correlação entre fenóis totais e atividade antioxidante

5.3.3 Distribuição na maçã

Com os resultados obtidos nas análises de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante nas 65 amostras de maçãs analisadas, um grande interesse foi despertado no intuito de se proceder à análise nas três partes que constituem a maçã, com a finalidade de verificar em qual destas são encontrados os maiores valores.

A Figura 19 demonstra a quantidade, em porcentagem média, de cada parte de uma maçã. Sendo que o mesocarpo representa quase a totalidade da maçã (78 - 80 %), seguido do endocarpo (10 - 12 %) e do epicarpo (8 - 10 %).

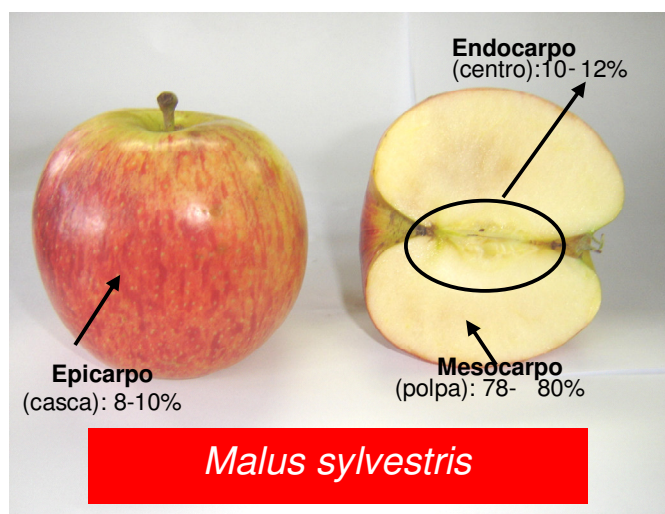


Figura 19 – Porcentagem média de cada parte da maçã

Na Figura 20, estão apresentados os extratos alcoólicos de compostos fenólicos de cada parte da maçã, para as principais maçãs cultivadas no Brasil (Gala, Fuji e Golden delicious) sem a presença da reação de escurecimento enzimático. A partir desse extrato foram realizadas análises de fenóis totais e atividade antioxidante.



Figura 20 – Extratos alcoólicos do epicarpo (casca), mesocarpo (polpa) e endocarpo (centro) das cultivares Gala, Fuji e Golden delicious

As Tabelas 8 e 9 demonstram os teores de fenóis totais e atividade antioxidante, respectivamente, no epicarpo (casca), mesocarpo (polpa) e endocarpo (centro) de cultivares de maçãs. A coluna designada de ‘total’, nas duas tabelas, é uma média representativa da fruta inteira e o erro relativo (%) foi calculado considerando o erro absoluto.

Para as 23 amostras analisadas, o extrato obtido do epicarpo da maçã teve maior teor de fenóis totais e atividade antioxidante que os extratos obtidos com o mesocarpo e endocarpo, o que representou, em média, 58 % do teor total encontrado na fruta. Segundo Nicolas et al. (1994), na casca da maçã o teor fenóis pode ser de 3 a 10 vezes superior às outras partes da fruta.

Seguido do epicarpo, o endocarpo, incluindo as sementes, contribuiu com, mais ou menos, 25 % do total de fenóis. O mesocarpo, de maneira geral, colabora com, aproximadamente, 17 % destes compostos; sendo que, dentre as amostras analisadas, apenas três cultivares (M-2/01, MRC-11/95 e M-13/00) tiveram o conteúdo de compostos fenólicos superior nesta parte da maçã.

Tabela 8 - Fenóis totais no epicarpo, mesocarpo e endocarpo de 19 cultivares de maçãs (mg.kg⁻¹)

Origem	Cultivar	N	Epicarpo	Mesocarpo	Endocarpo	Total	Erro (%)
SC	Gala	6	1114 ± 588,47	141 ± 4,72	317 ± 118,11	1147	37,05
SC	Fuji	6	778 ± 338,98	219 ± 102,51	285 ± 142,97	1164	10,14
SC	Golden delicious	3	116 ± 3,13	196 ± 4,00	304 ± 6,69	911	32,38
SC	Joaquina	6	463 ± 330,08	170 ± 11,40	178 ± 16,80	1573	48,44
PR	Gala	3	106 ± 0,31	49 ± 1,45	69 ± 2,00	595	62,35
Arg	Red delicious	3	365 ± 3,73	149 ± 1,00	152 ± 14,95	1245	46,51
Arg	Granny Smith	3	308 ± 3,02	193 ± 2,88	252 ± 2,08	1147	34,35
SC	M-12/00	3	475 ± 1,35	71 ± 2,70	158 ± 6,01	545	29,17
SC	M-6/00	3	450 ± 9,68	69 ± 1,11	134 ± 9,01	577	13,17
SC	M-11/00	3	660 ± 86,06	189 ± 4,11	283 ± 15,64	1012	11,86
SC	M-2/01	3	662 ± 25,03	194 ± 7,18	187 ± 4,09	1385	24,69
SC	M-8/01	3	752 ± 11,24	223 ± 2,25	295 ± 27,22	1352	6,07
SC	M-11/01	3	413 ± 19,25	95 ± 4,99	210 ± 7,47	736	2,45
SC	MRC-11/95	3	625 ± 18,71	325 ± 14,17	257 ± 9,32	1192	1,26
SC	M-13/00	3	476 ± 17,52	226 ± 2,46	203 ± 2,91	524	72,71
SC	Catarina	3	1042 ± 17,92	274 ± 1,27	364 ± 7,03	1342	25,19
PR	Carícia	3	708 ± 209,64	162 ± 1,09	301 ± 13,84	1583	26,03
PR	Eva	3	456 ± 14,35	101 ± 2,90	236 ± 1,88	885	10,40
SC	Royal Gala	6	472 ± 3,77	134 ± 30,35	178 ± 8,96	1123	30,19

No epicarpo, a cultivar Gala (SC) foi a que apresentou maiores teores de fenóis totais (1114 mg.kg⁻¹), seguida da cultivar Catarina (1042 mg.kg⁻¹). Com relação ao endocarpo, a cultivar Catarina foi a que obteve maiores teores de fenóis totais (364 mg.kg⁻¹) e a cultivar MRC-11/95 predominou em relação às demais no teor destes compostos presentes no mesocarpo (Tabela 9).

A atividade antioxidante no epicarpo de todas as amostras analisadas foi mais elevada, como pode ser observado na Tabela 9 (58 % do poder antioxidante total da fruta); seguido do endocarpo (24 %) e do mesocarpo (16 %), o que pode indicar uma correlação com o conteúdo de compostos fenólicos em cada parte analisada da fruta.

O alto desvio padrão apresentado na análise de atividade antioxidante (Tabela 9) em algumas cultivares podem ser explicados por dois fatores principais: (1) pelas diferenças oriundas da própria cultivar (TSAO; YANG, 2003; VAN DER SLUIS et al., 2001), visto que as maçãs Gala (SC), Fuji, Joaquina e Royal Gala tiveram duas amostras analisadas e (2) as safras em que foram analisadas (2005/2006 e 2006/2007). Aliado a este fator, outros também podem ter participado desta variação. Por exemplo, as amostras da cultivar Gala foram adquiridas em locais diferentes, sendo uma pertencente ao comércio local de Ponta Grossa, armazenada em câmara fria, enquanto a outra foi fornecida pela Epagri, sendo maçã ‘fresca’.

As duas amostras da cultivar Royal Gala possuíam diferentes níveis de pigmentação vermelha na casca, uma com muita pigmentação e a outra com pouca pigmentação.

Tabela 9 - Atividade antioxidante no epicarpo, mesocarpo e endocarpo de 19 cultivares de maçãs ($\mu\text{M.g}^{-1}$)

Origem	Cultivar	N	Epicarpo	Mesocarpo	Endocarpo	Total	Erro (%)
SC	Gala	6	23517 $\pm$ 18621	2029 $\pm$ 126,78	5157 $\pm$ 2506,13	14224	115,85*
SC	Fuji	6	7761 $\pm$ 2655,57	3703 $\pm$ 2083,94	4040 $\pm$ 1913,36	12706	25,62
SC	Golden delicious	3	1646 $\pm$ 442,59	2694 $\pm$ 17,16	2967 $\pm$ 107,26	12131	39,76
SC	Joaquina	6	7746 $\pm$ 1260,37	2002 $\pm$ 132,93	1100 $\pm$ 989,54	13447	3,58
PR	Gala	3	1441 $\pm$ 3,56	622 $\pm$ 18,84	881 $\pm$ 49,93	6987	57,86
Arg	Red delicious	3	4567 $\pm$ 31,70	1903 $\pm$ 24,45	2109 $\pm$ 41,31	16739	48,75
Arg	Granny Smith	3	3780 $\pm$ 58,92	2566 $\pm$ 156,19	3535 $\pm$ 106,57	14835	33,39
SC	M-12/00	3	5250 $\pm$ 55,52	597 $\pm$ 94,15	971 $\pm$ 49,12	5662	20,42
SC	M-6/00	3	2638 $\pm$ 257,65	253 $\pm$ 22,63	1523 $\pm$ 26,21	8450	47,76
SC	M-11/00	3	6435 $\pm$ 754,83	2554 $\pm$ 117,45	2820 $\pm$ 66,47	11749	22,61
SC	M-2/01	3	8299 $\pm$ 37,74	2164 $\pm$ 15,60	2491 $\pm$ 21,39	15095	17,63
SC	M-8/01	3	7551 $\pm$ 174,44	2242 $\pm$ 231,90	2677 $\pm$ 143,14	14073	7,95
SC	M-11/01	3	4688 $\pm$ 71,15	931 $\pm$ 37,26	2338 $\pm$ 91,07	8491	27,63
SC	MRC-11/95	3	6470 $\pm$ 214,34	2603 $\pm$ 16,19	3247 $\pm$ 56,36	13302	6,25
SC	M-13/00	3	4934 $\pm$ 193,24	174 $\pm$ 23,18	1831 $\pm$ 21,56	3472	129,18*
SC	Catarina	3	10066 $\pm$ 280,70	3359 $\pm$ 121,45	3416 $\pm$ 116,32	20680	40,43
PR	Carícia	3	7608 $\pm$ 150,69	3144 $\pm$ 77,55	3630 $\pm$ 64,25	17013	59,21
PR	Eva	3	5887 $\pm$ 28,05	1072 $\pm$ 14,30	2807 $\pm$ 42,70	5166	226,00*
SC	Royal Gala	6	5103 $\pm$ 2187,56	2189 $\pm$ 42,15	2405 $\pm$ 239,67	12798	12,38

Nota: (*) análises repetidas e confirmadas

5.3.4 Perfil fenólico das cultivares Gala, Fuji e Golden delicious

Além da concentração de fenóis totais, um largo número de compostos polifenólicos individuais também variam com a cultivar. O perfil e a concentração dos principais compostos nas maçãs cultivadas na Brasil – Gala, Fuji e Golden delicious – foi estabelecido nesse trabalho através da metodologia de HPLC (Tabela 10). Os principais grupos de polifenóis quantificados foram ácidos hidroxicinâmicos (ácido 5-cafeoilquinico e ácido 4-*p*-cumaroilquinico), flavan-3-óis e procianidinas (catequina, epicatequina, procianidina B1 e procianidina B2), dihidrochalconas (floridzina e floretina xiloglucosídeo), flavanóis e flavonóis (avicularina, rutina, quercitrina, isoquercitrina, reinoutrina, hiperosídeo, quercetina).

De acordo com a Tabela 10, o flavonol quercetina foi o composto polifenólico encontrado em menor quantidade, concordando com estudos de McGuie, Hunt e Barnett (2005), Guyot et al. (1997) e Spanos e Wrolstad (1992); não sendo quantificado por ter sido detectado somente em traços. A classe das procianidinas e flavanóis constitui os componentes

majoritários nas amostras analisadas (DICK et al., 1987; GUYOT et al., 1997, GUYOT et al., 1998, GUYOT et al., 2001) e o ácido clorogênico foi detectado em concentrações que variaram de 0,370 a 0,99 mg.g⁻¹, em base seca.

Nas três cultivares analisadas o flavonol catequina não foi detectado; segundo Sanoner et al. (1999) e Van der Sluis et al. (2001) o conteúdo deste composto em maçãs pode variar de 0 a 154 mg.kg⁻¹ de peso fresco, dependendo da fase de desenvolvimento da fruta (MOSEL; HERRMANN, 1974), além de ter seus teores diminuídos durante o período de estocagem (MOSEL; HERMAN, 1974; KOLESNIK et al., 1977).

Tabela 10 - Perfil fenólico das maçãs Gala, Fuji e Golden delicious (mg.g⁻¹, base seca) e atividade antioxidante (μM.g⁻¹, base úmida)

Compostos Fenólicos	CULTIVARES		
	Fuji	Gala	Golden delicious
Ácido 5-cafeoilquínico	0,399	0,374	0,370
Ácido 4- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,032	0,082	0,093
Outros ácidos hidroxicinâmicos	(nd)	(nd)	(nd)
Total Hidroxicinâmicos	0,431	0,456	0,463
(+)-Catequina	(nd)	(nd)	(nd)
(-)-Epicatequina	0,225	0,223	0,294
Procianidina B1	0,060	0,101	0,069
Procianidina B2	0,348	0,420	0,674
Total Procianidinas	4,108	5,430	6,940
Total Flavanóis	4,333	5,652	7,234
Floridzina	0,208	0,155	0,237
Floretina xiloglucosídeo	0,070	0,186	0,101
Total Dihidrochalconas	0,278	0,341	0,338
Avicularina	0,070	(t)	0,076
Rutina	0,028	0,029	0,073
Quercitrina	0,052	0,064	0,099
Isoquercitrina	0,042	0,094	0,026
Reinourtrina	0,052	0,063	0,033
Hiperosídeo	0,180	0,244	0,100
Quercetina	(t)	(t)	(t)
Total Flavonóis	0,424	0,494	0,407
Total Polifenóis	5295,000	6465,000	8302,000
Total Atividade Antioxidante	16086	8844	21485

Nota: (t) = traços; (nd) = não detectado

As principais dihidrochalconas encontradas em maçãs, segundo Durkee, Poapst (1965), Lommen et al. (2000) e Alonso-Salces et al. (2001) são os compostos floridzina

(floreína 2'- β -D-glucosídeo) e a floreína 2'- β -D-xilosil (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucosídeo. Nesse trabalho as mesmas dihidrochalconas foram encontradas, com um total, em peso seco, de 0,341; 0,278 e 0,338 mg.g⁻¹ para as cultivares Gala, Fuji e Golden delicious, respectivamente.

Muitos glicosídeos de quercetina têm sido identificados em maçãs. Nas cultivares Gala, Fuji e Golden delicious estes compostos foram detectados em quantidades equivalentes a 0,494, 0,424 e 0,407 mg.g⁻¹, respectivamente, sendo que o glicosídeo hiperosídeo apresentou a maior concentração nas três amostras analisadas. Segundo Golding et al. (2001) e Guyot et al. (1998) compostos como rutina, hiperosídeos (quercetina-3- β -D-galactosídeo), isoquercitrina (quercetina-3- β -D-glucosídeo), reinoutrina (quercetina-3- β -D-xilosídeo), avicularina (quercetina-3- α -L-arabinofuranosídeo) e quercitrina (quercetina-3- α -L-ramnosídeo) são encontrados em maçãs de forma freqüente.

A atividade antioxidante também foi determinada nas cultivares Gala, Fuji e Golden delicious (Tabela 10); esta última foi a que apresentou a maior atividade antioxidante e, conforme o perfil fenólico demonstrado na Tabela 10, a concentração de flavanóis e procianidinas, compostos que podem ser as responsáveis pela capacidade antioxidante (VAN DER SLUIS et al., 2002; VAN DER SLUIS; DEKKER; JONGEN, 2003; TSAO et al., 2005), foi mais elevada nesta cultivar. Tsao et al (2005) analisaram oito amostras de maçãs de Ontário, as quais também apresentaram altas concentrações de procianidinas. Outro estudo demonstrou que a atividade antioxidante dos glicosídeos de quercetina é mais elevada que a ação das procianidinas (CHINNICI et al., 2004).

5.4 INTENSIDADE DE PIGMENTAÇÃO VERMELHA EM MAÇÃS

Entre as mutações somáticas da cultivar Gala que afetaram a cor do epicarpo pode ser citada a Royal Gala e uma de suas mutações, a Galaxy. Estas três cultivares, de diferentes intensidades de cor vermelha denominadas de ‘muita pigmentação vermelha’ (MPV) e ‘pouca pigmentação vermelha’ (PPV), foram avaliadas com relação ao seu teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas frutas e no suco.

5.4.1 Caracterização fenólica e antioxidante das frutas

Na Tabela 11 podem ser observados os resultados médios de compostos fenólicos totais para as cultivares Gala, Royal Gala e Galaxy Gala. Na fruta inteira não foram observadas diferenças significativas no teor de fenóis totais entre as mutações somáticas, porém diferiram da cultivar Gala que apresentou o menor teor destes compostos ($906 \pm 22,49 \mu\text{g.g}^{-1}$). Nas partes da fruta estes teores apresentaram diferenças significativas ao nível de 5 %, sendo que o epicarpo contribuiu com 49,0; 61,5; e 53,3 % dos fenóis da maçã inteira, o mesocarpo com 25,0; 16,2 e 17,3 % e o endocarpo com 26,0; 22,3 e 30,6 % para as cultivares Gala, Galaxy Gala e Royal Gala, respectivamente. Segundo Awad et al. (2000) as diferentes classes de fenóis não são sintetizadas e distribuídas uniformemente na maçã e são influenciadas, durante o desenvolvimento da fruta, por fatores externos (nutrientes disponíveis, temperatura e luminosidade).

No mesocarpo, as cultivares Gala e Royal Gala (PPV) apresentaram diferenças significativas frente às demais amostras analisadas no que diz respeito aos compostos fenólicos totais, apresentando os maiores teores. A cultivar Gala apresentou uma concentração de $227 \mu\text{g.g}^{-1}$ de compostos fenólicos, enquanto a cultivar Royal Gala (PPV) apresentou um teor de $211 \mu\text{g.g}^{-1}$.

Os teores de fenóis no endocarpo para a cultivar Royal Gala (MPV) e Galaxy Gala (PPV) não foram diferentes estatisticamente. O maior teor de compostos fenólicos para esta parte da maçã foi detectado na cultivar Royal Gala - PPV - ($407 \mu\text{g.g}^{-1}$), o que representou 30,6 % do total destes compostos na fruta (Tabela 11).

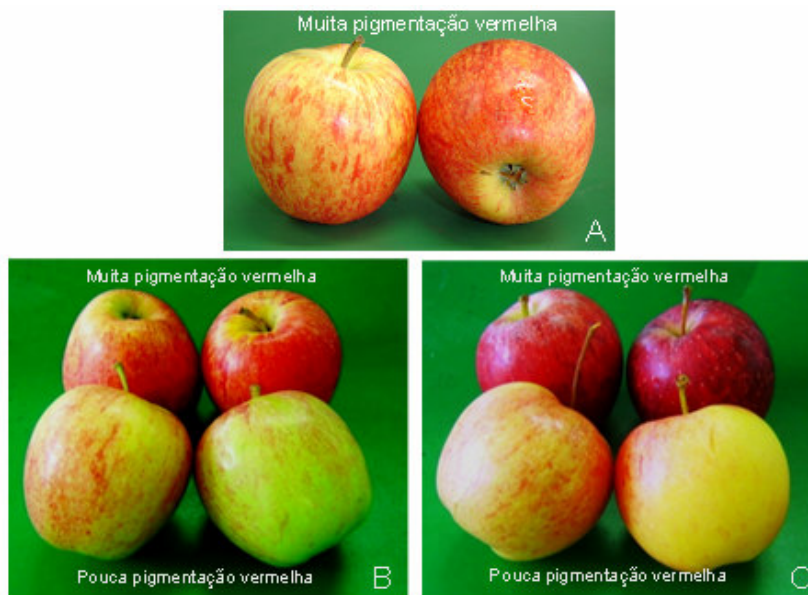


Figura 21 - Amostras de maçãs com muita e pouca pigmentação vermelha: (A) cv. Gala; (B) cv. Royal Gala e (C) cv. Galaxy Gala

Com relação ao epicarpo, foi a parte da maçã com maior teor de compostos fenólicos, concordando com estudos de Nicolas et al. (1994). As cultivares Galaxy Gala (PPV) e Royal Gala (MPV) não apresentaram diferenças estatísticas nos teores de fenóis nesta parte da fruta. De acordo com a Figura 21, pode-se observar que a cultivar Galaxy Gala (MPV), devido a sua intensa coloração vermelha, apresentou a casca com o maior teor de fenóis totais ($745 \mu\text{g.g}^{-1}$), o que representa em torno de 61,5 % do total dos fenóis, contrapondo a cultivar Gala que apresentou um teor de $445 \mu\text{g.g}^{-1}$ (49 %).

Na Tabela 11 estão expressos os valores de atividade antioxidante. As análises na cultivar Gala, em todas as suas partes, apresentaram os maiores valores, mesmo com baixo teor de fenóis. A cultivar Royal Gala (MPV e PPV) também merece atenção especial no que diz respeito à atividade antioxidante. Para esta cultivar também foi obtido um elevado valor em todas as partes analisadas, embora o conteúdo de fenóis totais tenha se sobressaído somente no epicarpo, caracterizando assim um possível efeito varietal, o qual também foi observado por McGhie, Hunt e Barnett (2005), em cultivares de maçãs na Nova Zelândia.

Tabela 11 – Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas maçãs cultivares Gala, Galaxy Gala e Royal Gala, fruta inteira e suas partes

Cultivar	Coloração	Partes da fruta			
		Inteira	Epicarpo	Mesocarpo	Endocarpo
<i>Fenóis totais (mg.kg⁻¹)</i>					
Gala		906 ^b ± 22,49	445 ^d ± 19,34	227 ^a ± 7,36	234 ^{bc} ± 5,48
Galaxy Gala	MPV	1146 ^a ± 47,58	745 ^a ± 19,34	181 ^b ± 7,36	219 ^c ± 5,48
	PPV	1086 ^a ± 22,49	629 ^b ± 35,30	181 ^b ± 9,72	276 ^b ± 19,92
Royal Gala	MPV	1096 ^a ± 29,78	636 ^b ± 12,71	178 ^b ± 11,58	282 ^b ± 9,01
	PPV	1149 ^a ± 24,68	536 ^c ± 15,43	211 ^a ± 13,02	407 ^a ± 23,87
<i>Atividade Antioxidante (μM.g de amostra⁻¹)</i>					
Gala		17559 ^a ± 22,49	8111 ^a ± 19,34	4754 ^a ± 7,36	5027 ^a ± 5,48
Galaxy Gala	MPV	6526 ^d ± 153,93	3130 ^c ± 645,43	2353 ^{bc} ± 156,30	1047 ^d ± 152,73
	PPV	6160 ^d ± 329,04	1530 ^d ± 361,56	2148 ^b ± 84,59	2471 ^c ± 88,05
Royal Gala	MPV	12050 ^c ± 486,96	6388 ^b ± 211,27	2483 ^b ± 156,30	3897 ^b ± 233,16
	PPV	13546 ^b ± 519,18	5655 ^b ± 296,10	2714 ^b ± 119,94	5182 ^a ± 241,07

Nota: MPV: muita pigmentação vermelha; PPV: pouca pigmentação vermelha.

No mesocarpo, a cultivar Gala foi o a que obteve maior valor de atividade antioxidante (4754 μM.g⁻¹), diferindo estatisticamente das demais. As outras amostras analisadas apresentaram pequenas diferenças, sendo que a Royal Gala (PPV) apresentou o menor valor para esta análise (2148 μM.g⁻¹). Isso pode ser devido à presença de ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido clorogênico, nesta parte da maçã; uma vez que, juntamente com os flavan-3-óis, como a catequina, também encontrada no mesocarpo da fruta, são importantes substratos para a polifenoloxidase (NICOLAS et al., 1994; OSZMIANSKI; LEE, 1990).

Ainda na Tabela 11, pode ser observado que o endocarpo das cultivares Royal Gala (PPV) e Gala possui um maior poder antioxidante (5182 e 5027 μM.g⁻¹, respectivamente) comparado às amostras Galaxy Gala (PPV e MPV) e Royal Gala (MPV), as quais foram significativamente diferentes entre si.

Com relação ao epicarpo das maçãs analisadas, a cultivar Gala apresentou um maior poder antioxidante comparado às outras analisadas. A cultivar Royal Gala, com pigmentação vermelha menos intensa que a Galaxy Gala (Figura 21), apresentou maior poder antioxidante devido aos elevados teores de flavonóis que foram 50 % superiores (Tabela 12), o que reforça o baixo potencial de oxi-redução das antocianinas (VAN DER SLUIS et al., 2000).

Com relação ao teor de flavonóis na fruta inteira, a cultivar Royal Gala (PPV) foi a que apresentou maior concentração (382,83 mg.100g⁻¹), de acordo com a Tabela 12. No epicarpo, a maior concentração deste grupo fenólico foi encontrada na Royal Gala (MPV). Este elevado teor de flavonóis encontrado nesta cultivar pode ser o responsável por sua atividade antioxidante ter sido superior a da Galaxy Gala.

Tabela 12 - Determinação de antocianinas e flavonóis na maçã inteira e no epicarpo das cultivares Galaxy Gala e Royal Gala

Cultivar	Coloração	Partes da fruta	
		Inteira	Epicarpo
<i>Antocianinas, mg.100g⁻¹</i>			
Galaxy Gala	MPV	11,50 ± 0,92	537,11 ± 2,36
	PPV	5,79 ± 0,25	54,44 ± 2,25
Royal Gala	MPV	13,73 ± 0,43	327,97 ± 6,07
	PPV	6,09 ± 1,55	42,99 ± 1,73
<i>Flavonol, mg.100g⁻¹</i>			
Galaxy Gala	MPV	60,69 ± 1,30	655,15 ± 7,26
	PPV	23,37 ± 1,99	558,57 ± 2,74
Royal Gala	MPV	38,57 ± 0,84	1163,39 ± 11,20
	PPV	382,83 ± 1,56	371,32 ± 5,98

O teor de antocianinas, tanto para a fruta inteira quanto para o epicarpo, foi maior nas cultivares com maior pigmentação vermelha, como era esperado (Tabela 12). O aumento de pigmentos antocianínicos na casca da maçã, atribuído com combinações de baixa temperatura durante a noite e elevados períodos de horas de sol durante o amadurecimento da fruta (REAY, 1999), podem ser, em parte, os responsáveis pelas diferenças na concentração de polifenóis na mesma cultivar.

Na Tabela 13 estão expressos os fatores de correlação e os valores de R^2 entre os teores de compostos fenólicos e da atividade antioxidante nas cultivares Gala, Galaxy Gala e Royal Gala. Os valores de 0,56 a 0,99 indicam uma forte correlação entre estes dois parâmetros quando a fruta não é oxidada. A correlação, $R^2=0,56$, na Galaxy Gala pode ser explicada pela variação de fenóis individuais na composição das cultivares; o que pode explicar a diferença encontrada no valor de atividade antioxidante (McGUIE; HUNT; BARNETT, 2005).

Tabela 13 - Fator de correlação e valor de R^2 entre os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante das cultivares Gala, Galaxy Gala e Royal Gala

Cultivar	Coloração	Fator de Correlação	R^2
Gala	---	19,35	0,99
Galaxy Gala	MPV	5,37	0,82
	PPV	5,18	0,56
Royal Gala	MPV	11,05	0,98
	PPV	11,71	0,99

5.4.2 Efeito no processamento de suco de maçã

Os compostos fenólicos nos sucos oxidados (OX) foram drasticamente reduzidos com o escurecimento enzimático, chegando a perdas que variaram desde 48 até 83 % (Tabela 14). Esta variação ocorre em função da composição fenólica substrato da enzima polifenoloxidase, bem como da sua concentração e atividade (SHAHIDI; NACZK, 2004; NOGUEIRA et al., 2003).

Os teores de fenóis totais para os sucos das amostras com muita e pouca pigmentação vermelha sem oxidação foram semelhantes, porém estes valores após a reação de escurecimento enzimático foram diferentes. A oxidação enzimática afetou os teores de fenóis totais de forma mais intensa nas maçãs com pouca pigmentação vermelha, com redução em torno de 79 %, o que indica que as amostras com muita pigmentação vermelha apresentaram um suco com maior teor de compostos fenólicos de baixa oxidação, possivelmente antocianinas (Tabela 14).

Os elevados valores de atividade antioxidante no suco não oxidado (NOX) podem ser provenientes do próprio processo de extração, trituração seguida de prensagem. Além disso, determinadas classes de compostos fenólicos que apresentam elevada atividade antioxidante (cianidina 3-galactosídeo, procianidinas, quercetina, ácido clorogênico e floridzina) presentes nos vacúolos celulares, juntamente com outros compostos facilmente extraídos (açúcares e ácidos orgânicos) no processamento, aumentam significativamente os teores da atividade antioxidante (TSAO et al., 2005).

Tabela 14 – Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante nos sucos oxidado e não oxidado das cultivares Galaxy Gala e Royal Gala

Cultivar	Cor do epicarpo	Fenóis totais mg.L ⁻¹	Atividade antioxidante μM.g ⁻¹
Galaxy Gala	MPV- NOX	813,27 ^b ± 33,38	15805,95 ^b ± 616,77
	MPV-OX	423,88 ^c ± 12,11	4593,11 ^c ± 44,44
	PPV- NOX	970,15 ^a ± 26,02	22793,43 ^a ± 307,86
	PPV- OX	235,82 ^d ± 15,80	1293,43 ^d ± 20,33
Royal Gala	MPV- NOX	957,87 ^a ± 5,27	16970,27 ^a ± 461,66
	MPV-OX	287,89 ^b ± 5,17	3392,80 ^b ± 75,31
	PPV- NOX	955,22 ^a ± 11,66	16610,33 ^a ± 572,52
	PPV- OX	166,17 ^c ± 29,87	1990,61 ^c ± 8,13
Gala	NOX	705 ^a ± 5,31	14072 ^a ± 625,89
	OX	367 ^b ± 20,86	4008 ^b ± 88,28

Nota: (MPV) muita pigmentação vermelha; (PPV) pouca pigmentação vermelha; (OX) oxidado; (NOX) não oxidado.

A reação de escurecimento enzimático diminuiu significativamente os valores de atividade antioxidante dos sucos de maçã. Essa perda variou entre 70 a 94 % para a cv. Galaxy (MPV) e para a cv. Galaxy (PPV), respectivamente. As perdas foram maiores para as frutas com pouca pigmentação vermelha, o que pode estar relacionado ao teor de antocianinas.

5.5 AVALIAÇÃO FENÓLICA E ANTIOXIDANTE NO PROCESSAMENTO DE SUCOS DE MAÇÃS

De modo geral, o teor de compostos fenólicos, bem como sua composição, no processamento de sucos de frutas, incluindo o de maçã, difere na quantidade liberada durante a ruptura dos vacúolos e parede celular dependendo do processo tecnológico empregado, além da cultivar utilizada no processo.

Neste item foram examinados os teores de fenóis e atividade antioxidante após diferentes operações unitárias utilizadas na indústria de processamento de suco de maçã a fim de identificar pontos de perdas destes compostos e conseqüentemente da atividade antioxidante.

5.5.1 Efeito das operações unitárias nos teores de fenólicos totais

Os dados apresentados na Tabela 15 demonstram os teores de compostos fenólicos totais para os produtos resultantes do processamento do suco de maçã (suco bruto, bruto pasteurizado, despectinizado, despectinizado pasteurizado, despectinizado concentrado e clarificado) e para as cultivares utilizadas neste processo (Gala, Fuji e Golden delicious), todos na presença e ausência do inibidor do escurecimento enzimático. Estes produtos foram analisados separadamente para posterior avaliação do efeito das operações unitárias, comumente utilizadas na indústria.

Os teores de fenóis totais nas maçãs utilizadas no processamento de suco oscilaram entre 1026 a 1224 mg.kg⁻¹ nas frutas não oxidadas (NOX), isto é, na presença de cisteína (2,0 mM). Nas frutas oxidadas (OX), pela reação da PPO, estes valores variaram entre 699 e 882 mg.kg⁻¹ (Tabela 15). Estas diferenças ocorrem devido às alterações bioquímicas que acometem os polifenóis devido ao processo oxidativo (NICOLAS et al., 2004).

É possível observar na Tabela 15 que os sucos brutos obtidos com as maçãs não oxidadas não tiveram alteração de fenóis totais quando comparados com a fruta de origem; diferente dos sucos brutos obtido com as frutas oxidadas, os quais apresentaram redução no teor de fenóis totais em, aproximadamente 14 %, quando comparadas às frutas que foram utilizadas no processamento. A razão desta redução está em dois fatores: 1) oxidação enzimática nas etapas de trituração e prensagem e 2) a própria prensagem, pode promover a associação entre as procianidinas das maçãs e polissacarídeos insolúveis da parede celular da fruta (GUYOT et al., 2003).

Tabela 15 - Efeito do processamento de suco nos teores de fenólicos totais (mg.L⁻¹)

Produtos/operações unitárias	Fuji		Gala		Golden delicious	
	NOX	OX	NOX	OX	NOX	OX
Fruta	1224	822	1149	699	1026	779
Suco bruto*	1292	679	1332	616	1292	679
Suco bruto pasteurizado	1215	512	1267	457	1215	514
Suco despectinizado, centrifugado, filtrado	1106	380	1048	350	1439	427
Suco despectinizado, centrifugado, filtrado, pasteurizado	1054	nd	969	358	1423	370
Suco despectinizado pasteurizado	1123	404	1041	399	1123	335
Suco despectinizado crioconcentrado**	3086	1902	6238	2222	6989	2033
Suco clarificado	1040	355	916	351	1040	303

Nota: (*) suco obtido após processo de prensagem, analisado após dez minutos; (**) concentrado 5 vezes.

Com relação aos outros produtos obtidos com as frutas oxidadas as perdas foram marcantes em várias etapas do processamento do suco de maçãs, nas três cultivares analisadas. O processo de pasteurização do suco bruto alterou os teores de fenóis totais, diminuindo estes valores em torno de 25 % (Tabela 15).

A operação unitária de despectinização, com posterior centrifugação e filtração, afetou os teores de compostos fenólicos, como pode ser observado na Tabela 15. A cultivar Fuji, que apresentava teores de 679 mg.L⁻¹ antes da despectinização, passou para 380 mg.L⁻¹, ou seja, perdas de 39 %; a cultivar Gala alterou seus teores em 43 % e a cultivar Golden delicious teve sua concentração de fenóis diminuída em 37 %.

Quando o suco despectinizado foi somente pasteurizado, isto é, sem passar por processos de centrifugação e filtração, os teores de fenóis totais foram alterados ainda mais, aproximadamente 41; 35 e 51 %, nas cultivares Fuji, Gala e Golden delicious, respectivamente. Isto pode ter ocorrido pela formação de precipitados – *haze* – entre compostos fenólicos (proantocianidóis) e proteínas, carboidratos e/ou minerais (LEA; TIMBERLAKE, 1978; HASLAM; LILLEY, 1988) e não somente pelo processo de pasteurização (Tabela 17).

O processo de clarificação, em todos os sucos oxidados, foi uma operação marcante em relação às perdas nos fenólicos totais, concordando com estudos de Shahidi e Nacz (1995). A cultivar Golden delicious foi a que apresentou maior decréscimo, com teores iniciais de fenóis iguais a 679 mg.L⁻¹, passando a 303 mg.L⁻¹, uma perda significativa de 55 %. As outras cultivares também apresentaram perdas acentuadas durante esta etapa, 48 % para a Fuji e 43 % para a Gala (Tabela 15). O processo de clarificação com gelatina, segundo Lea e Timberlake (1978) apresenta perdas significativas nos conteúdos de proantocianidóis, o que, somado com a despectinização, gera perdas importantes.

O suco concentrado foi obtido através do processo de crioconcentração do despectinizado, o qual foi concentrado até que o mesmo atingisse valores de, aproximadamente 50 °Brix. Esta operação aumentou os teores de fenóis totais nos sucos não oxidados e oxidados das três cultivares (Tabela 15). Este aumento foi, em média, de quatro vezes para primeiro e de três vezes para o segundo.

O processo de pasteurização, despectinização e clarificação não alteraram o teor de compostos fenólicos para os sucos obtidos com as frutas não oxidadas, nas três cultivares analisadas. Segundo Cliff et al. (1991) e Sataque e Wosiacki (1987) a concentração de fenóis totais, durante o processamento de suco de maçã, é modificada principalmente pela reação destes compostos com a polifenoloxidase, a qual, neste caso, não ocorreu devido à presença do inibidor enzimático.

Os teores de compostos fenólicos nos sucos não oxidados, ao final do processo, após a etapa de clarificação, obtiveram valores iguais a 1040, 916 e 1040 mg.L⁻¹ para as cultivares, Fuji, Gala e Golden delicious, respectivamente. As maçãs utilizadas neste processo apresentaram, de acordo com a Tabela 15, teores de fenóis de 1224, 1149 e 1026 mg.L⁻¹ para as cultivares Fuji, Gala e Golden delicious respectivamente, o que demonstra a estabilidade destes compostos frente às diversas operações utilizadas no processamento de suco de maçã não oxidado. Além disso, foi possível comprovar a migração de compostos polifenólicos hidrossolúveis presentes na maçã para o suco (KONDO et al., 2002).

5.5.2 Efeito das operações unitárias na atividade antioxidante

Na Tabela 16 estão apresentados os dados referentes à atividade antioxidante nos diversos sucos obtidos com as cultivares Fuji, Gala e Golden delicious, na presença e na ausência do inibidor enzimático. Além dos métodos de cultivo e da cultivar de maçã, o processamento industrial de suco pode afetar a concentração final de compostos fenólicos, bem como afetar a sua bioatividade (DEKKER; VERKERK; JONGEN, 2000).

Para os produtos obtidos com a fruta não oxidada as diferenças nos valores de atividade antioxidante não foram afetadas de maneira expressiva, da mesma forma que ocorreu com os teores de fenóis totais. O mesmo não pode ser descrito para os produtos obtidos com as frutas oxidadas, onde cada etapa do processamento afetou a capacidade antioxidante em proporções diferenciadas.

Tabela 16 - Efeito do processamento de suco na atividade antioxidante ($\mu\text{M.mL}^{-1}$)

Produtos/operações unitárias	Fuji		Gala		Golden delicious	
	NOX	OX	NOX	OX	NOX	OX
Fruta	19511	7621	18622	11324	14701	8216
Suco bruto*	22859	6850	22748	6210	16194	6466
Suco bruto pasteurizado	18956	5114	19457	4399	23012	4320
Suco despectinizado, centrifugado, filtrado	20896	3669	18982	4117	2706	3687
Suco despectinizado, centrifugado, filtrado, pasteurizado	17144	nd	15583	4245	22466	3779
Suco despectinizado pasteurizado	17300	4012	19011	9210	19402	4721
Suco despectinizado crioconcentrado	85660	19012	86365	27255	104354	15818
Suco clarificado	16473	3704	20102	4530	23516	3357

Nota: (*) suco obtido após processo de prensagem, analisado após dez minutos. (**) concentrado 5 vezes.

A atividade antioxidante nas frutas oxidadas que deram origem aos sucos apresentaram valores iguais a 7621, 11324 e 8216 $\mu\text{M.mL}^{-1}$, para as cultivares Fuji, Gala e Golden delicious, respectivamente. Durante a obtenção do suco bruto houve diminuição nos teores de forma desigual para as três amostras; 10 % para a cultivar Fuji, 45 % para a Gala e 21 % para a Golden delicious (Tabela 16). Esta diferença pode ser justificada pela modificação no perfil fenólico que pode ocorrer durante o processo oxidativo (CHEYNIER; BASIRE; RIGAUD, 1989; GUYOT et al., 2003).

De acordo com a Tabela 16, o processo de pasteurização também afetou a atividade antioxidante, com perdas alcançando valores de 29 % em média, sendo que a cultivar Golden delicious foi a que obteve maior alteração.

A contribuição para a diminuição na atividade antioxidante também pode ser atribuída ao processo de despectinização, o que acarreta em redução de 46; 38 e 43 % nas cultivares Fuji, Gala e Golden delicious, respectivamente. Com a clarificação a atividade antioxidante nos sucos não se altera drasticamente, permanecendo próximos aos valores encontrados nos sucos despectinizados.

Ao final do processamento, os sucos obtidos com frutas oxidadas permanecem com, aproximadamente 40 % da atividade antioxidante presente na fruta inteira, contrariando estudos de Van der Sluis (2005), o qual demonstrou que, somente 3 – 10 % da atividade antioxidante presente em maçãs foram encontradas no suco.

Com relação aos sucos obtidos com as frutas não oxidadas, da mesma forma como acontece com os teores de fenóis totais, a atividade antioxidante não sofre alterações mensuráveis, o que indica que a oxidação enzimática, além de gerar perdas desses compostos intensifica as perdas pelas operações unitárias.

O processo de crioconcentração aumentou os valores de atividade antioxidante nos sucos obtidos com as cultivares Fuji, Gala e Golden delicious, em uma proporção média de 4 vezes para os sucos não oxidados e 3 vezes para os sucos oxidados.

5.6 AVALIAÇÃO FENÓLICA E ANTIOXIDANTE NO PROCESSAMENTO DE FERMENTADO DE MAÇÃ

Este item apresenta e discute os resultados sobre a influência da transformação da maçã em suco e fermentado no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante. As frutas utilizadas foram as cultivares Gala e Fuji pela sua representatividade de produção (90 %) e a cultivar Joaquina devido à qualidade do seu fermentado de maçã (FERTONANI et al., 2006).

5.6.1 Características dos mostos e da fermentação alcoólica

Na Tabela 17 podem ser observados os resultados médios de componentes dos mostos despectinizados das três cultivares em estudo. Os teores de açúcares totais variaram de 10,63 a 12,46 g.100mL⁻¹ para as cultivares Fuji e Joaquina, respectivamente. Segundo a classificação de Beech (1993) com base no teor de açúcar, o mosto da cv. Fuji é classificado como regular (1047-1056 m.v⁻¹) e o mosto das cultivares Gala e Joaquina como médias (1057-1064 m.v⁻¹). A acidez dos mostos é considerada baixa (< 0,45 g.100mL⁻¹) (DRILLEAU, 1991) e o nitrogênio consiste em um importante elemento para o crescimento das leveduras, apresentando valores considerados elevados (> 150 mg.L⁻¹) para o processamento do fermentado de maçã (NOGUEIRA, 2003). A cv. Fuji apresentou o maior teor de fenóis totais 451 mg.L⁻¹, considerada como amarga (> 200 mg.L⁻¹) segundo Lea e Drilleau (2003), porém ainda é um valor muito baixo quando comparada aos teores de mostos de maçãs industriais européias que podem alcançar até 5000 mg.L⁻¹. A maçã utilizada pelo setor industrial brasileiro consiste em frutas do descarte da classificação comercial, ou seja, maçãs com baixos teores de fenólicos, principalmente de substâncias adstringentes (taninos).

Tabela 17 - Características físico-químicas dos mostos despectinizados das cultivares de maçãs Gala, Fuji e Joaquina

Parâmetros físico-químicos	Mostos varietais		
	Gala	Fuji	Joaquina
Açúcar redutor total, g.100mL ⁻¹	11,41 ± 0,51	10,63 ± 0,61	12,46 ± 0,55
Frutose, g.100mL ⁻¹	7,87 ± 0,77	7,09 ± 0,54	8,01 ± 0,88
Glucose, g.100mL ⁻¹	1,43 ± 0,26	1,84 ± 0,80	1,87 ± 0,72
Sacarose, g.100mL ⁻¹	2,10 ± 1,09	1,69 ± 0,68	2,57 ± 0,54
Acidez total, g.100mL ⁻¹	0,25 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,26 ± 0,01
Nitrogênio total, mg.L ⁻¹	150,49 ± 3,65	149,48 ± 1,67	213,97 ± 5,57
Fenóis totais, mg.L ⁻¹	451 ± 6	255 ± 9	408 ± 4

Na Figura 22 A pode ser observado o consumo de nitrogênio pela levedura *Saccharomyces* durante a fase de multiplicação celular. A levedura teve um tempo de adaptação ao meio de aproximadamente 24 h e a população máxima de $6,0 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ foi alcançada nos três mostos varietais com aproximadamente 5 dias após o inóculo. O teor superior de nitrogênio no mosto da cultivar Joaquina não influenciou a população máxima de leveduras, devido ao mosto da cvs. Gala e Fuji apresentarem concentração classificada como alta, resultando em nitrogênio residual nos três produtos. O consumo dos açúcares e a produção de álcool durante a fermentação alcoólica podem ser observados na Figura 22 B. A diferença do teor alcoólico está diretamente relacionado ao teor de açúcar inicial, sendo a cultivar Joaquina com maior teor alcoólico 7,8 % (v/v) enquanto os fermentados de Gala e Fuji ficaram com 6,5 e 6,9 % (v/v) ao final de 350 horas (15 dias) de fermentação alcoólica.

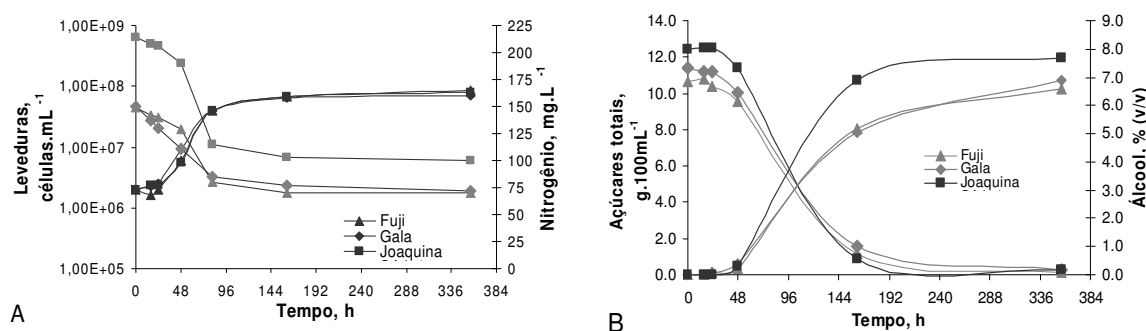


Figura 22 - Características da fermentação alcoólica da levedura *S. cerevisiae* Uvaferm CK nos mostos varietais das cultivares Fuji, Gala e Joaquina: **(A)** crescimento das leveduras e utilização do nitrogênio e **(B)** evolução dos açúcares e produção de etanol.

5.6.2 Efeito do processamento nos teores de fenólicos totais e na atividade antioxidante

Os teores de fenóis totais e atividade antioxidante nas frutas, no suco despectinizado e no fermentado das cultivares Gala, Fuji e Joaquina podem ser observados na Tabela 18. O teor de fenóis totais variou de 1165 a 2049 mg.L⁻¹ caracterizando um efeito varietal para as cultivares Fuji e Joaquina, respectivamente.

No suco despectinizado os teores diminuíram para 451, 408 e 255 mg.L⁻¹ no suco das cvs. Gala, Joaquina e Fuji, respectivamente. Estas perdas estão relacionadas principalmente

com a reação de escurecimento enzimático e com a operação de despectinização (NOGUEIRA et al., 2003).

Os teores finais de polifenóis dependem da concentração e da atividade da enzima polifenoloxidase e do teor dos seus substratos, os ácidos fenólicos, do pH, da temperatura e da concentração de oxigênio dissolvido no suco (MURATA, 1997). Estes compostos participam da cor, *flavor* e adstringência dos mostos (LEA; DRILLEAU, 2003) e podem influenciar diretamente no consumo de oxigênio dissolvido através da reação de escurecimento enzimático (NICOLAS et al., 1994). Entretanto, em razão de trasfegas e da filtração do mosto pode ter sido dissolvido oxigênio, nutriente este considerado limitante no processamento de fermentados de maçãs, porém não foi observada influência no crescimento das leveduras que se mantiveram acima da população média de $5,0 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005). Após o inóculo das leveduras, desenvolvimento da fermentação alcoólica dos três sucos despectinizados os teores finais de fenóis não apresentaram diferenças importantes (Tabela 18).

A atividade antioxidante e fenóis totais no suco apresentaram uma diminuição significativa quando comparados com os valores da fruta (Tabela 18). Durante e após a fermentação alcoólica a atividade antioxidante demonstrou valor semelhante ao do suco despectinizado. Entretanto, os valores finais de atividade antioxidante variaram de 1853 a 3594 μ M.mL⁻¹, ou seja, esse valor no fermentado de maçã será em função da composição fenólica que pode ou não ser substrato da polifenoloxidase.

Tabela 18 - Evolução dos teores de compostos fenólicos (mg.L⁻¹) e atividade antioxidante (μ M.mL⁻¹) em diferentes produtos da maçã

Cultivar	Produtos	Fenóis totais	Atividade antioxidante
Gala	Fruta inteira*	1219 $\pm$ 53	15850 $\pm$ 460
	Suco despectinizado	451 $\pm$ 6	4376 $\pm$ 63
	Fermentado de maçã	397 $\pm$ 2	3594 $\pm$ 66
Fuji	Fruta inteira*	1165 $\pm$ 29	12706 $\pm$ 428
	Suco despectinizado	255 $\pm$ 9	1909 $\pm$ 84
	Fermentado de maçã	257 $\pm$ 9	1853 $\pm$ 60
Joaquina	Fruta inteira*	2049 $\pm$ 66	14722 $\pm$ 106
	Suco despectinizado	408 $\pm$ 4	2889 $\pm$ 55
	Fermentado de maçã	402 $\pm$ 10	2781 $\pm$ 152

Nota: (*) sem oxidação enzimática.

Na Figura 23 os teores de fenóis do mosto após a prensagem, sem oxidação, foram 1085 $\pm$ 265; 958 $\pm$ 94 e 787 $\pm$ 64 mg.L⁻¹ para Gala, Joaquina e Fuji respectivamente; na mesma ordem e após 10 minutos de oxidação em temperatura ambiente (25°C), os valores

diminuíram para 866 ± 88 ; 611 ± 25 e 708 ± 82 mg.L^{-1} . Após a despectinização e filtração os valores foram 451 ± 6 ; 408 ± 4 e 255 ± 9 mg.L^{-1} . Após 9 horas de fermentação os valores de fenóis estabilizaram até o final do processo (360 horas) com 397 ± 2 ; 402 ± 10 e 257 ± 9 mg.L^{-1} para Gala, Joaquina e Fuji, respectivamente. O tempo para despectinizar e filtrar correspondeu em aproximadamente 2 horas, até o processo de filtração e as perdas foram devido à reação de escurecimento enzimático. Segundo Guyot et al. (2003) a classe de ácidos hidroxicinâmicos, substratos da PPO, apresenta um elevado rendimento (65 %) no processamento de suco de maçã. A filtração retém a polifenoloxidase que após esse tempo (2 h) possivelmente já tenha oxidado completamente o suco, porém a celulose do papel filtro pode reter compostos fenólicos e participar na diminuição desses compostos (NOGUEIRA et al., 2003).

A atividade antioxidante apresentou efeito semelhante, os teores iniciais no mosto foram 10807 ± 1530 ; 8473 ± 853 e 6449 ± 1272 $\mu\text{M.mL}^{-1}$ para Gala, Fuji e Joaquina, respectivamente (Figura 22). No início da fermentação, após a despectinização e filtração, os valores foram de 4376 ± 63 ; 1909 ± 84 e 2889 ± 55 $\mu\text{M.mL}^{-1}$ para as três cultivares respectivamente e, após 384 h de fermentação, os valores foram 3594 ± 66 ; 1853 ± 60 e 2781 ± 152 $\mu\text{M.mL}^{-1}$ para Gala, Fuji e Joaquina, respectivamente.

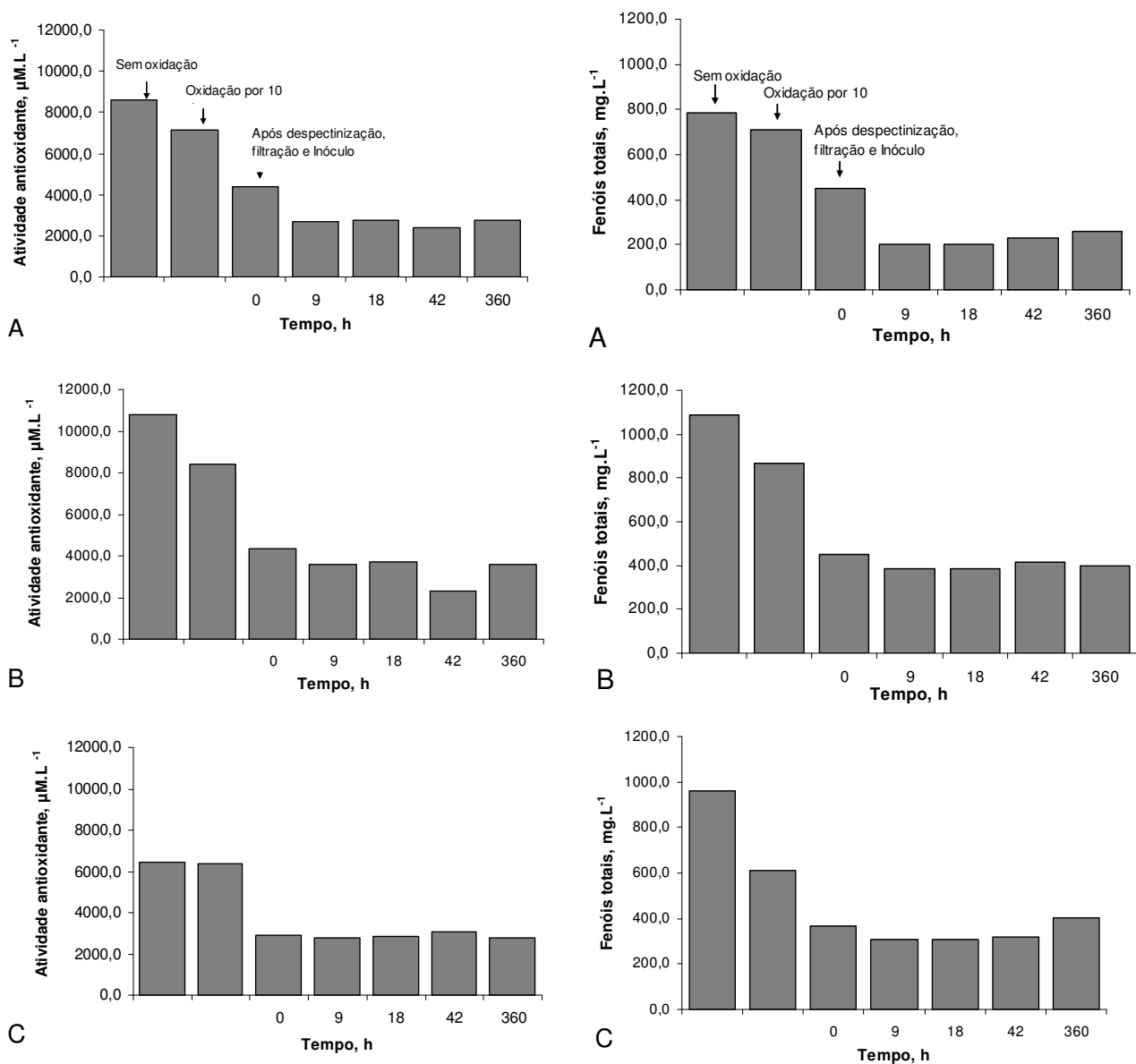


Figura 23 - Efeito do processamento de fermentado de maçã nos teores de atividade antioxidante e compostos fenólicos de três mostos varietais: **(A)** cv. Fuji; **(B)** cv. Gala e **(C)** cv. Joaquina

5.7 AVALIAÇÃO FENÓLICA E ANTIOXIDANTE DA FARINHA DE BAGAÇO DE MAÇÃ

O principal subproduto gerado na agroindústria da maçã – o bagaço – não poderia ser deixado de lado neste trabalho, pois é um produto com elevados teores de sólidos solúveis, fibras alimentares, minerais e compostos fenólicos.

Na Tabela 19 podem ser observados os teores de fenóis totais (mg.kg^{-1}) e a atividade antioxidante ($\mu\text{M.g}^{-1}$) em dezoito amostras de farinha de bagaço de maçã. O processo de obtenção de farinha do bagaço de maçã concentrou, em média, seis vezes os teores de fenóis totais encontrados na fruta.

O maior teor de compostos fenólicos foi encontrado na amostra da cultivar M-2/01 (8560 mg.kg^{-1}), seguida da cultivar Catarina (7147 mg.kg^{-1}) e Golden delicious (5081 mg.kg^{-1}). As frutas inteiras, dessas cultivares, apresentaram altos teores de fenóis, comparados às demais amostras analisadas, 1043, 1391 e 1055 mg.kg^{-1} , respectivamente.

O menor teor de compostos fenólicos foi encontrado na amostra da cultivar M-6/00 (2293 mg.kg^{-1}), a qual apresentou conteúdo de fenóis totais de 636 mg.kg^{-1} .

Tabela 19 – Teores de fenóis totais e atividade antioxidante em farinha de bagaço de maçã

Cultivar	Fenóis Totais mg.kg^{-1}	CV (%)	Atividade Antioxidante $\mu\text{M.g}^{-1}$	CV (%)
Carícia*	$4618 \pm 141,77$	3,07	$68232 \pm 1336,75$	3,45
Catarina	$7147 \pm 50,33$	0,70	$44475 \pm 325,57$	1,87
Eva*	$3873 \pm 577,61$	14,91	$25090 \pm 976,24$	3,10
Fuji	$3567 \pm 617,89$	17,33	$30196 \pm 2556,79$	3,30
Fuji*	$4390 \pm 331,51$	7,55	$70015 \pm 489,99$	1,82
Gala	$4267 \pm 223,01$	5,23	$39556 \pm 396,51$	0,89
Gala*	$4574 \pm 110,15$	2,41	$59913 \pm 1040,10$	3,23
Golden delicious*	$5081 \pm 61,10$	1,20	$77235 \pm 1131,64$	4,69
Granny Smith	$2830 \pm 127,02$	4,49	$36677 \pm 854,43$	1,84
Joaquina	$4870 \pm 140,48$	2,88	$38784 \pm 661,11$	2,39
M-11/00	$3203 \pm 179,06$	5,60	$31516 \pm 1126,61$	2,85
M-11/01	$2707 \pm 50,33$	1,86	$27617 \pm 481,89$	1,60
M-12/00	$3590 \pm 132,29$	3,68	$26875 \pm 2127,38$	5,80
M-13/00	$2617 \pm 806,46$	30,82	$17406 \pm 1557,72$	6,21
M-2/01	$8560 \pm 279,46$	3,26	$77482 \pm 2300,13$	3,37
M-6/00	$2293 \pm 25,47$	1,11	$24144 \pm 1809,83$	3,02
M-8/01	$4367 \pm 79,53$	1,82	$46323 \pm 1510,83$	2,16
MRC-11/95	$3193 \pm 108,82$	3,41	$32236 \pm 1637,31$	2,12

Nota: *Safra 2006/2007.

Os valores de atividade antioxidante nas dezoito amostras analisadas variaram de 24144 a 68232 $\mu\text{M.g}^{-1}$, o que pode ser explicado através das diferenças encontradas entre as cultivares com relação aos compostos fenólicos (BURDA et al., 1990). A cultivar Carícia foi a que obteve maior capacidade antioxidante na fruta inteira, o que refletiu quando a farinha de bagaço de maçã foi analisada. Assim como os teores de compostos fenólicos, a atividade antioxidante foi elevada na farinha, quatro vezes, em média.

Parte dos compostos fenólicos da maçã, mais especificamente as procianidinas, podem ficar retidas no bagaço após a operação de prensagem das frutas (GUYOT et al., 2003), o que pode justificar os altos teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante neste subproduto.

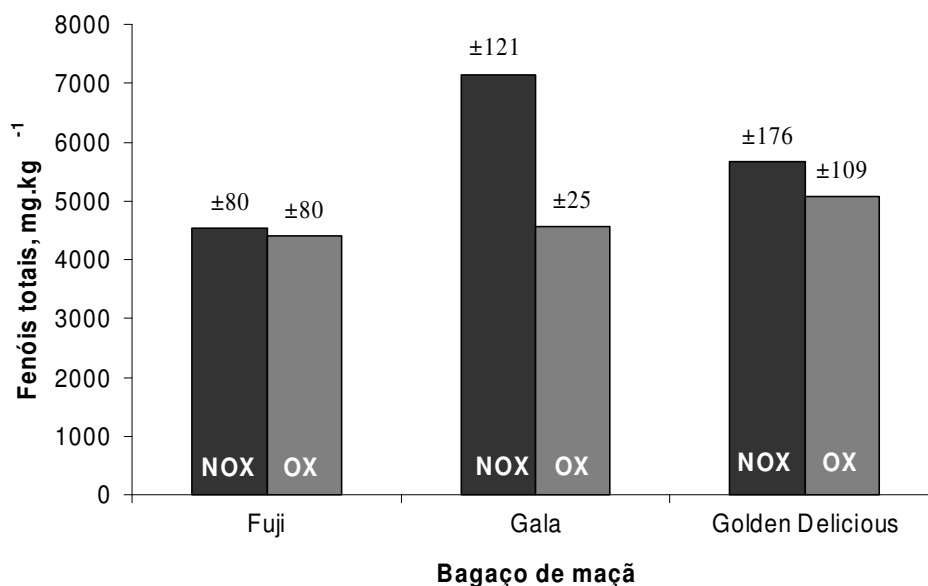


Figura 24 – Teores de fenóis totais em bagaço de maçã não-oxidado (NOX) e oxidado (OX) das cultivares Fuji, Gala e Golden delicious

Os teores de fenóis totais apresentados em farinhas de bagaço de maçãs (cv. Fuji, Gala e Golden delicious) na presença e ausência do inibidor de escurecimento enzimático podem ser observados na Figura 24. A farinha da cultivar Gala foi a que apresentou maiores perdas de compostos fenólicos quando a cisteína não estava presente, aproximadamente 37 %, diminuindo seus teores de 7154 para 4574 mg.kg^{-1} . A cultivar Fuji apresentou a menor diferença entre as amostras oxidadas e não oxidadas (3,4 %).

A temperatura durante a secagem e extração, afeta a estabilidade dos compostos fenólicos, através de degradação química, perdas por volatilização e decomposição térmica

(IBAÑEZ et al., 1999); este último pode ser o principal mecanismo causador da diminuição nos teores de polifenóis em bagaço de maçã (LARRAURI, 1997).

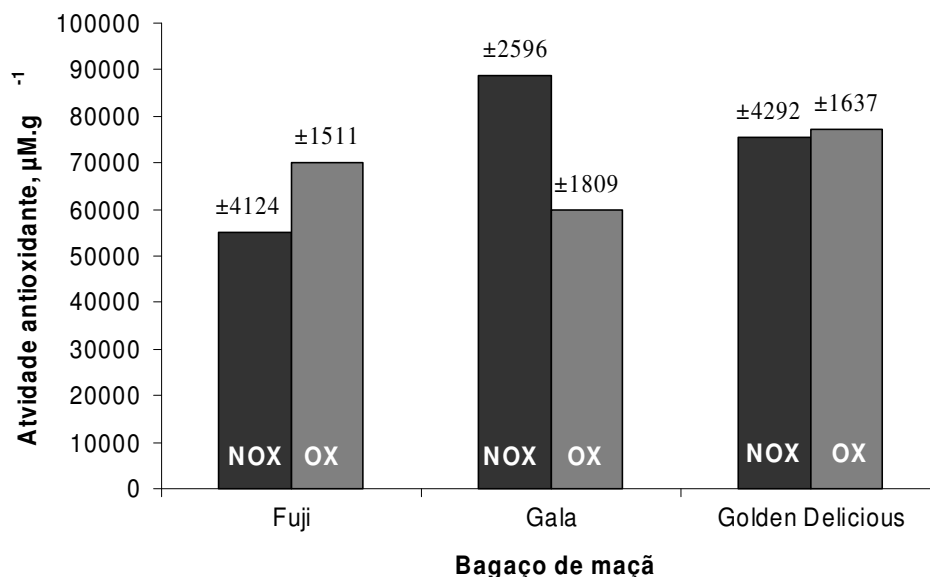


Figura 25 – Atividade antioxidante em bagaço de maçã não-oxidado (NOX) e oxidado (OX) das cultivares Fuji, Gala e Golden delicious

A atividade antioxidante nas amostras de farinha de bagaço de maçã, analisadas na presença e ausência de cisteína (Figura 25) apresentou, para a cultivar Gala, valores mais elevados na amostra não oxidada (NOX), 88737 $\mu\text{M.g}^{-1}$, comparados aos valores encontrados para a amostra oxidada (OX), 59913 $\mu\text{M.g}^{-1}$.

A cultivar Fuji e Golden delicious apresentaram resultados inesperados com relação à capacidade antioxidante entre as amostras não oxidadas e oxidadas. Com relação a cultivar Golden delicious às diferenças apresentadas entre as amostras não foi diferente significativamente, enquanto a cultivar Fuji apresentou valores de 54978 $\mu\text{M.g}^{-1}$ (NOX) e 70015 $\mu\text{M.g}^{-1}$ (OX), que pode ser explicado pela composição de fenóis retido no bagaço (GUYOT et al., 2003), do tempo e forma de processo de extração do suco e da atividade da polifenoloxidase que permaneceu no bagaço (SPANOS; WROLSTAD, 1992).

6 CONCLUSÕES

As 65 amostras de maçãs, safras 2005/2006 e 2006/2007, analisadas nesse trabalho apresentaram diferenças nos teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante tanto na fruta inteira quanto nas suas partes (epicarpo, mesocarpo e endocarpo), com maiores teores no epicarpo (casca), 2 a 3 vezes superior que a somatória dos teores no meso e endocarpo. Quanto a classificação das cultivares, mais de 50 % das frutas cultivadas no Brasil foram classificadas com alta atividade antioxidante, com destaque para a cultivar Carícia; 30 % foram classificadas com média atividade, incluindo as de produção mais expressiva no país, e 13 % com baixa atividade.

O perfil fenólico nas maçãs Gala, Fuji e Golden delicious foram semelhantes. Os componentes encontrados em maiores quantidades foram o ácido 5-cafeoilquínico, (-)-epicatequina, procianidina B2 e floridzina. A cultivar Golden delicious apresentou valores superiores de flavonóis e procianidinas o que pode justificar a elevada atividade antioxidante quando comparada às outras duas amostras.

O modelo de regressão linear entre os teores de fenóis totais e a atividade antioxidante foi significativa, com $R^2 = 0,7396$.

Amostras de maçãs provenientes da mesma região e de mutações somáticas da mesma cultivar variaram muito entre si, no que diz respeito aos teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Em frutas com diferentes intensidades de pigmentação vermelha os teores de compostos fenólicos foram semelhantes. A atividade antioxidante variou significativamente entre as cultivares; porém, maçãs com muita pigmentação vermelha apresentaram atividade antioxidante semelhante às frutas da mesma cultivar com pouca pigmentação vermelha. Os maiores teores de compostos fenólicos e uma elevada atividade antioxidante foram encontrados no epicarpo destas frutas, parte que também demonstrou maiores quantidades de flavonóis, o que pode ser a razão pelo maior valor de atividade antioxidante.

Durante o processamento de suco de maçã, foram observadas perdas de compostos fenólicos com diminuição de substâncias benéficas à saúde, devido à reação de escurecimento enzimático.

As principais perdas de compostos fenólicos e atividade antioxidante no processamento de fermentado de maçã foram observadas antes do processo fermentativo pela oxidação enzimática e no momento da despectinização.

As farinhas de bagaço de maçãs analisadas apresentaram diferenças significativas com relação ao teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Os fenóis e a atividade antioxidante foram de aproximadamente 2 a 10 vezes maiores que em relação aos valores nas frutas, o que demonstra um produto com potencial antioxidante para ser utilizado na formulação de alimentos. A oxidação enzimática apresentou influência na concentração de compostos fenólicos no bagaço da cultivar Gala, porém não no bagaço das cultivares Fuji e Golden delicious.

Os resultados desse estudo claramente demonstram que as maçãs cultivadas no Brasil são, em grande parte, frutas com elevado potencial antioxidante. Além disso, produtos desta fruta podem ser boas fontes de compostos fenólicos antioxidantes, desde que inibidores do escurecimento enzimático estejam presentes. O conhecimento destes e de muitos outros aspectos podem fornecer às indústrias e processadores de alimentos, que têm como foco os compostos protetores de saúde, uma maneira de otimização de processos, buscando a preservação de compostos biologicamente ativos.

REFERÊNCIAS

ABPM. Associação Brasileira de Produtores de Maçã. **Dados estatísticos sobre a cultura da macieira**. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br>>. Acesso em: 04 fev. 2007.

ADEGOKE, G. O. et al. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**. v. 35, n. 4, p. 283-298, 1998.

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.

AWAD, M. A. et al. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of "Elstar" and "Jonagold" apples during development and ripening. **Science Horticultural**, 90, p. 69-83, 2001.

AWAD, M. A.; DE JAGER, A.; VAN WESTING, L. M. Flavonoide and clorogenic acid levels in apple fruit characterisation of variation. **Science Horticultural**, v. 83, p. 249-263, 2000.

BABSKY, N.E., WROLSTAD, R.E., DURST, R.W. Influence of commercial shipping on the color and composition of apple juice concentrate. **Journal of Food Quality** n. 12, p. 355–367. 1989.

BATE-SMITH, E.D. Haemanalysis of tannins — the concept of relative astringency. **Phytochemistry**. v. 12, n. 4, p. 907–912, 1973.

BEECH, F. W. Cider-making and cider research. **Fermentation**. v. 6, n. 4, p. 259-270, 1993.

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

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.

BENZIE, L. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymology** v. 299, p. 15-27, 1999.

BENZIE, L. F. F.; SZETO, Y. Y. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 633-636, 1999.

BEVERIDGE, F. M.; HARRISON, J. E. Nonenzymatic browning in pear juice concentrate at elevated temperatures. **Journal of Food Science**. v. 49, 1984.

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

BIRCH, A. E. et al. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 4502-4507, 2001.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1992. p. 39-50.

BRASIL. Norma de identidade e qualidade da sidra. **Portaria nº746, de 24 de outubro de 1974**. D.O.U. Brasília, Diário Oficial da União: 16-35, 1974.

BRAVERMAN, J. B. S. **Introduction to the Biochemistry of Foods**. New York: Elsevier Publishing Co., 1963.

BROUILLARD, R. The *in vivo* expression of anthocyanins colour in plants. **Phytochemistry**. v. 22, n. 6, p.1311-1323, 1983.

BURDA, S. et al. Phenolic compounds and their changes in apple during maturation and cold storage. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 38, p. 945-948, 1990.

BUTLER, L.G. Protein-polyphenol interactions: nutritional aspects, in **Proceeding. 16th International Conference Groupe Polyphenols**, 16, Part II, p.11–18, 1992.

CHEYNIER, V.; BASIRE, N.; RIGAUD, J. Mechanism of *trans*-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 37, p. 1069-1071, 1989.

CHINICCI, F. et al. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 4684-4689, 2004.

CHIPAULT, J. R. et al. The antioxidant properties of natural spices, **Food Research**, n. 17, p. 46–55, 1952.

CLIFF, M. et al. Juice extraction process and apple cultivar influences on juice properties. **Journal of Food Science** v. 56, n. 6, p. 1614-1627, 1991.

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

DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Novas cultivares de macieira: proposta de nova composição de pomares com polinizadoras/produtoras. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 10, n. 2, p. 25-30, jun. 1997.

DICK, A. J. et al. Quercetin glycosides and chlorogenic acid: inhibitors of apple β -galactosidase and of apple softening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 798–800, 1985.

DICK, A. J.; SMITH, K. C. Quercetin glucosides and galactosides: substrates and inhibitors of apple β -galactosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 923–926, 1990.

DOWNING, D. L. Apple cider. In: DOWING, D. L. **Processed apple products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989, p. 169-187

DRAKE, S. R., ELFVING, D. C., EISELE, T. A. Harvest maturity and storage affect quality of ‘cripps pink’ (pink lady) apples. **Horticultural Techniques**. v. 12, n. 3, p. 388–391, 2002.

DRILLEAU, J. F. Produits cidricoles. Quelques mots sur les composés phénoliques (tanins). **Technologie**. v. 23, p. 21-22, 1991.

DURKEE, A. B.; POAPST, P. A. Phenolic constituents in core tissues and ripe seed of McIntosh apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 13, p. 137–139, 1965.

DZIEZAK, J. D. Antioxidants the ultimate answer to oxidation. **Food Technology**. v. 40, n. 9, p. 94-100, 1986.

DZIEZAK, 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.

EPAGRI. **A cultura da Macieira**. 2. ed. Florianópolis: GMC/ Empresa de pesquisa Agropecuaria e Extensão Rural de Santa Catarina. 743p. 2002.

ESKIN, N. A. M. **Biochemistry of Foods**. 2. ed. San Diego: Academic Press. 1990.

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

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Databases*. In: **Toda Fruta**. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?>. Acesso em 26 de maio de 2006.

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

FERTONANI, H. C. R; SIMÕES, D.R.S.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Potencial da maçã variedade Joaquina como matéria-prima para o processamento agroindustrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p.434-440, 2006

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative determination of anthocyanins. Determination of total anthocyanins and degradation index for cranberry juice. **Journal Food Science**, v. 33, p. 78-83, 1968.

GOERGE, J. B. et al. Extending storage life of fresh-cut apples using natural products and their derivatives. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 1-6, 1999.

GOLDING, J. B. et al. Fate of apple peel phenolics during cold storage. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2283–2289, 2001.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. The inhibition of enzymes by tannins. **Phytochemistry**. v. 4, n. 1, p.185-192, 1965.

GORINSTEIN, S. et al. Comparative Contents of Dietary Fiber, Total Phenolics, and Minerals in Persimmons and Apples. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 952-957, 2001.

GURBUZ, G.; LEE, C. Y. Color of minimally processed potatoes as affected by modified atmosphere packaging and antibrowning agents. **Journal of Food Science**. v. 62, p. 572-575, 1997.

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

GUYOT, S. et al. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. Kermerrien) skin and pulp. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 351-357, 1997.

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. Kermerrien). **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 Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6240-6247, 2003.

HADDOCK, E. A. et al. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants: biogenetic and molecular taxonomic considerations. **Phytochemistry**, v. 21, n. 5, p.1049–1051, 1982.

HALLIWELL, et al. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work? **Critical Review in Food Science and Nutrition**. n. 35, p. 7-20, 1995.

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

HARBORNE, J. B. **The flavonoids: Recent Advances, in Plant Pigments**. London: Academic Press, p. 298–343, 1988.

HASLAM, E.; LILLEY, T. H. **Critical Review Food Science Nutritional**. v. 27, p. 1-40, 1988.

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

HEMINGWAY, R. W. Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives. In: HEMINGWAY, R.W.; KARCHESY, J. J. **Chemistry and Significance of Condensed Tannins**. New York: Plenum Press, 1989, p.83–98.

HEINONEM, 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.

HOULIHAN, C. M.; HO, C.; CHANG, S. S. The structure of rosmariquimome – a new antioxidant isolated form *Rosmarinus officinalis* L.. **Journal of the American Oil Chemistry's Society**. v. 62, n. 1, p. 96-98, 1985.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola municipal. Banco de Dados Agregados do IBGE, Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo2.asp?e=v&p=PA&z=t&o=10. Acesso em: 14abr. 2006.

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.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. **Natural Food Colorants**. 2. ed. Glasgow, UK: Blackie Academic & Professional, 1996, p. 244–309.

JANICK, I. et. al. Apples. In: **FRUIT Breeding tree and tropical fruits**. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 1-77.

JANOVITZ-KLAPP, A. H. et al. Inhibition studies on apple polyphenoloxidase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 38, p. 926-931, 1990.

JANZATTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 523-528, 2003.

JARVIS, B. Cider, Perry, Fruit Wines, and Other Fermented Fruit Beverages. Cap. 6. In: ARTHEY, D., ASHURST, P. R. **Fruit Processing. Nutrition, Products, and Quality Management**. 2. ed. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, 2001. p. 111-148.

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

JOSLYN, M. A.; GOLDSTEIN, J. L. Astringency of fruits and fruit products in relation to phenol content. **Advances in food research**. New York: Academic Press. v. 13, 1964, p.179-209.

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

JULIEN, A.; TRIOLI, G.; DULAU, L. Maîtrise de la fermentation alcoolique : les facteurs de croissance de la levure et la prévention des arrêts. Partie 2 : Gestion de la fermentation alcoolique et prévention des arrêts de fermentation. **Revue des Enologues**, n. 101, p. 25-29, 2001.

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

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

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

KOLESNIK, A. et al. Changes in polyphenols during storage of fruits and vegetables. **Prikl. Biokhim. Mikrobiol**. n.13, p. 333-339. 1977,

KONDO et al. Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivar. **Scientia Horticulturae**. v. 96, p. 177-185, 2002.

LANCASTER, J. E. Regulation of skin color in apples. **CRC Critical Reviews of Plant Science**. v. 10, p. 487–502, 1992.

LARRAURI, J. A. et al. Pineapple Shell as a Source of Dietary Fiber with Associated Polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 45, n. 10, p. 4028-4031, 1997.

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.

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

LEA, A. G.; ARNOLD, G. M. The phenolics of ciders: bitterness and astringency. **Journal of Science And Food Agricultural**. v. 29, p. 478-483, 1978.

LEA, A.; DRILLEAU, J.F. Cider-making. In: **Fermented Beverage Production**, London: Ed. LEA, 2003, p. 59-87.

LEE, C. Y.; SMITH, N. L. Apples: An Important Source of Antioxidants in the American Diet. **New York Fruit Quarterly**. v. 8, n. 2, p.15-17, 2000.

LEE, S. S. et al. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**. v. 11, p. 641-649, 1981.

LIDSTER, P. D.; MCRAE, K.B. Effects of vacuum infusion of a partially purified β -galactosidase inhibitor on apple quality. **Horticultrual Sciense**, v. 20, p.80–82, 1985.

LISTER, C. E.; LANCASTER, J. E.; SUTTON, K. H. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and green apple cultivar. **Journal of Science and Food Agricultural**, v. 64, p. 155–161, 1994.

LOMMEN, A. et al. Application of directly coupled HPLC-NMR-MS to the identification and confirmation of quercetin glycosides and phloretin glycosides in apple peel. **Analytical Chemistry**. v. 72, p. 1793–1797, 2000.

LU, Y.; L. FOO, Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**. v. 68, n. 1, p. 81-85, 2000.

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

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

MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains**. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc., 1994, 362p.

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**. 2005.

MILLER, S. S. Apple cultivars – Current situation and trends around the world, an introduction. **Fruit Varieties Journal**. v. 2, n. 45, p. 75-76, 1991.

MOLNAR-PERL, L.; FRIEDMAN, M. Inhibition of browning by sulfur amino acids. Apples and potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 38, p.1652-1656, 1990.

MONTEIRO, M.C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**. v.28, n.4, p. 637-641, 2005.

MOSEL, H. D.; HERRMANN, K. Changes in catechins and hydroxycinnamic acid derivatives during development of apples and pears. **Journal of Science and Food Agricultural**. v. 25, p. 251–256, 1974.

MURATA, M. Apple polyphenol oxidase and enzymatic browning. **Recent Res. Devel. in Agric. and Biol. Chem**. n. 1, p. 15-24, 1997.

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. **Tecnologia de processamento sidricola. Efeitos do oxigênio e do nitrogênio na fermentação lenta da sidra**. PhD Thesis, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2003.

NOGUEIRA, et al. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos em suco de maçã. **Publicatio UEPG Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 9, n. 3, p. 7-14, 2003.

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

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

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

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

PODSEDEK, A. et al. Compositional characterisation of some apple varieties. **European Food Research and Technology**, v. 210, n. 4, p. 268-272, 2000.

POKORNI, J. Natural antioxidants for food use, a review. **Trends Food Science Technology**. n. 2, p.223-227, 1991.

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.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 8, p.3396-3402, 2000.

PYYSALO, T.; TORKKEWLI, H.; HONKANEN, E. The thermal decarboxylation of some substituted cinnamic acids. **Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung**, n.10, p.145–149, 1977.

RASKIN, J. Protein–polyphenol interactions: nutritional aspects, **In: Proceedins. 16th International Conference Groupe Polyphenols**, 16, Part II, 1992, p.11–18.

REAY, P. F. The role of low temperatures in the development of the red blush on apple fruit (“Granny Smith”). **Science Horticultural**. v.79, p. 113-119, 1999.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**. v. 2, n. 4, p.304-309, 1997.

RICHARD, F. C. et al. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 39, p. 841–847, 1991,

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

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.

SATAQUE, E. Y; WOSIACKI, G. Caracterização da Polifenoloxidase da Maçã (*Malus domestica*, var. Gala). **Arq. Biol. Tecnol.** v. 30, n. 2, p.287-299, 1987.

SCHEMIN, M. H. C. **Obtenção de pectina alimentícia a partir de bagaço de maçã**. 2003. Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná: Curitiba.

SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 910, n. 2, p. 265-273, 2001.

SCHUSTER, B.; HERRMANN, K. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2761–2764, 1985.

SHAHIDI, F. Antioxidants in plants and oleaginous seeds. In: MORELLO, M.J., SHAHIDI, F., HO, C. T. **Free Radicals in Food: Chemistry, Nutrition, and Health Effects**. Washington, D.C: ACS Symposium Series 807. American Chemical Society, 2002, p. 162–175.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Functional Foods: Their Role in Health Promotion and Disease Prevention. **Journal of Food Science**. v. 69, n .5, p. 146-149, 2004.

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.; HO, C. T. **Phytochemicals and phytopharmaceuticals**. Champaign, II: ACS Press, 2000.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics - Sources, Chemistry, Effect, Applications**. Pennsylvania: Technomic, 1995, 321p.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. New York: CRC Press, 2004, 365p.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. n. 32, p. 67-103, 1992.

SHANNON, C. T.; PRATT, D. E. Apple polyphenol oxidase activity in relation to various phenolic compounds. **Journal of Food Science**, v. 32, p. 479–482, 1967.

SHI, J.; MAZZA, G.; MAGUER, M. L. **Functional foods: Biochemical and Processing Aspects**. Ontario: CRC Press, 2002, p. 432.

SHIH, F. F.; DAIGLE, K. W. Antioxidant properties of milled-rice co-products and their effect on lipid oxidation in ground beef. **Journal of Food Science**. v. 68, p. 2672-2675, 2003.

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.

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

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.

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

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.

TANNER, H., BRUNNER, H. R. **Getränke Analytik - Untersuchungsmethode für dia Labor- und Betriebspraxis**. Wädesnwill: Verlag Helles, 1985, p. 206.

TIMBERLAKE, C. F; BRIDLE, P. The anthocyanins of apples and pears. The occurrence of acyl derivatives. **Journal of Food Science Agricultural**. v. 22, p. 509–513, 1971.

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, 2005, p. 4989-4995.

TSAO, R.; YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**. v. 1018, n. 1, p. 29-40, 2003.

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

VAN DER SLUIS, A. A. **A Chain Analysis of the Production of ‘Healthy’ Apple Juice. The Case of Polyphenolic Antioxidants**. 2005. PhD Thesis Wageningen University, The Netherlands.

VAN DER SLUIS, A. A. et al. F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3606-3613, 2001.

VAN DER SLUIS, A. A.; DEKKER, M. ; JONGEN, W. M. F. Polyphenolic antioxidants in apple. Effect of storage conditions on four cultivars. **Acta Horticultural**. v. 600, p. 533-540, 2003.

VAN SUMERE, C. F. Phenols and phenolic acids. In: **Methods in Plant Biochemistry. Vol. I. Plant Phenolics**. Harbone, J. B. London: Academic Press, 1989, p.29.

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

WHITAKER, J. R. Polyphenol Oxidase.. In: WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2. ed. New York: Marcel Oesker, InC. 1994. Cap. 24, p. 543-564.

WHITAKER, J. R.; RAMÍREZ, E. C.; VIRADOR, V. M. Polyphenol Oxidase. Cap. 39, p.509-523. In: WHITAKER, J. R; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of Food Enzymology**. New York: Marcel Dekker, InC. 2003.

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

World Apple and Pear Association. In: <http://www.wapa-association.org/newsdetail.asp?id=16>, 2006. Acesso em: 20out. 2006.

WOSIACKI, G. et al. Apple varieties growing in subtropical areas. The situation in Santa Catarina-Brazil. **Fruit Processing**, v. 12, n. 1, p. 19-28, 2002.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Apple varieties growing in subtropical areas. The situation of Parana - Brazil. **Fruit Processing**, v. 11, n. 5, p. 177-182 , 2001.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Suco de maçã. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de Bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, Legislação e Mercado**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005, p. 255-292.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. Brazilian Apple Production - A fews years later. **Fruit Processing**, v. 12, p. 472-475, 2000.

WROLSTAD et al., Processing and storage influences on the chemical composition and quality of apple, pear, and grape juice concentrates. In: Jen, J.J. (Ed.), **Quality Factors of Fruits and Vegetables**. American Chemical Society, Washington, DC, 1989, p. 270–292.