

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

AMANDA ALVES PRESTES

**AVALIAÇÃO DO ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO EM MAÇÃS HÍBRIDAS:
POTENCIAL TECNOLÓGICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

PONTA GROSSA

2019

AMANDA ALVES PRESTES

**AVALIAÇÃO DO ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO EM MAÇÃS HÍBRIDAS:
POTENCIAL TECNOLÓGICO E ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pertencente ao Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito exigido para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Alberti

PONTA GROSSA

2019

P936 Prestes, Amanda Alves
Avaliação do escurecimento enzimático em maçãs híbridas: potencial tecnológico e atividade antioxidante / Amanda Alves Prestes . Ponta Grossa, 2019.
109 f.

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

Orientadora: Profa. Dra. Aline Alberti.

1. Atividade enzimática. 2. Polifenoloxidase. 3. Peroxidase. 4. Compostos fenólicos. 5. Atividade antioxidante. I. Alberti, Aline. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciências e Tecnologia de Alimentos. III.T.

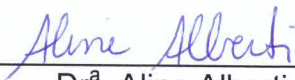
CDD: 664

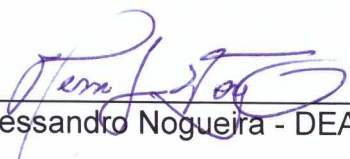
TERMO DE APROVAÇÃO

AMANDA ALVES PRESTES

Avaliação do escurecimento enzimático em maçãs híbridas: potencial tecnológico e antioxidante

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

Orientador: 
Dr^a. Aline Alberti - DEA/UEPG - PR


Dr. Alessandro Nogueira - DEA/UEPG - PR


Dr. Ivo Mottin Demiate - DEA/UEPG - PR


Dr. Marcus Vinicius Kvitschal - EPAGRI/Caçador - SC

Ponta Grossa, 01 de março de 2019.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial, por todo o amor e força. Agradeço por todos os caminhos de luz que Ele concede em minha vida;

Aos meus pais, José e Cleonice Prestes, pelo amor, confiança e apoio. Sou grata por sempre apostarem em meus sonhos e são os responsáveis pelo que sou hoje. Essência de sabedoria e bondade definem as duas pessoas que são o meu exemplo de vida;

À minha querida avó, Sinira Pereira (*in memoriam*), por ser a minha eterna referência em todo o meu caminhar. Uma mulher forte, de princípios e fé. O céu é muito mais lindo com sua presença;

À Patrícia Alves, por todos os conselhos de uma vida, por estar presente em pensamento, sempre. O laço de sangue é um mero detalhe;

À Taiza Bertoni, pela força e amor em todos esses anos de amizade. Minha eterna melhor amiga;

Ao Marcio Vogt pelo apoio incondicional em todos os momentos. Sou feliz por compartilhar a vida ao seu lado;

À minha orientadora professora Dr^a. Aline Alberti, não apenas na realização deste trabalho, como em todos os anos de convívio e orientação no Grupo de Trabalho sobre Maçã (GTM). O aprendizado e amizade, com certeza, irei levar sempre comigo;

Ao meu orientador em diversos trabalhos no GTM, professor Dr. Alessandro Nogueira, pelos conselhos e conhecimentos compartilhados com todos os seus alunos. A admiração será sempre presente, vivenciada e compartilhada;

À estação experimental da EPAGRI de Caçador-SC, pelas amostras cedidas para a realização deste trabalho. A parceria, juntamente com os pesquisadores Dr. Marcus Vinicius Kvitschal e Dr. Marcelo Couto, foram fundamentais no decorrer da pesquisa;

Aos colegas e professores do GTM e ETL-Queijos, pela parceria e ajudas no decorrer de todas as etapas do trabalho;

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela estrutura no decorrer da pesquisa;

Ao órgão financiador da bolsa de estudos, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior);

E, por fim, agradeço nestas linhas a todos que contribuíram para a concretização deste trabalho!

RESUMO

Maçãs e seus produtos são importantes fontes de compostos fenólicos. Quando em contato com oxigênio, os teores destes compostos, assim como sua atividade antioxidante, são reduzidos devido à ação de duas enzimas principais, a Polifenoloxidase (PPO) e a Peroxidase (POD), ocorrendo o fenômeno do escurecimento enzimático. Contudo, existem cultivares de maçãs oriundas de melhoramentos genéticos que, mesmo após submetidas a um estresse oxidativo, possuem um escurecimento tardio. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o escurecimento enzimático em maçãs, com o intuito de averiguar a ocorrência diminuta deste fenômeno em cultivares híbridas e avaliar o potencial tecnológico das frutas e respectivos sucos. Dezesesseis (16) variedades de maçãs, entre elas sete (7) comerciais e nove (9) híbridas (derivadas do cruzamento genéticos das cultivares Imperatriz e Primícia), foram avaliadas em relação ao escurecimento enzimático. Para tal, foram determinados os parâmetros Croma, ângulo *Hue* e índice de escurecimento. Na fruta inteira, foi determinada a atividade das enzimas PPO e POD, teor de ácido ascórbico e o teste da sua efetividade, além da quantificação dos principais compostos fenólicos individuais. Para as frutas intactas e seus respectivos sucos, foram avaliados os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, assim como sua atividade antioxidante pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS. Análises físico-químicas de pH, acidez total titulável e sólidos solúveis foram feitas nos sucos de todas as frutas estudadas. As maçãs híbridas codificadas como 170/23 e 170/25 obtiveram os menores índices de escurecimento de polpa (78,63 e 57,58, respectivamente), como também em seus sucos (4,8 e 4,4, nesta ordem). Já as cultivares Gala e Maxi Gala apresentaram maior escurecimento de polpa (114 e 218, respectivamente), assim como para os respectivos sucos, com índice de escurecimento médio de 384,5. As maçãs híbridas 170/23 e 170/25 também apresentaram menor atividade enzimática, correspondendo, em relação às sete cultivares comerciais de escurecimento mais expressivo, a apenas 19% da atividade da PPO e 2,3% da POD. Na determinação do teor de ácido ascórbico, estas duas cultivares também se destacaram com os maiores teores: 29,95 mg/100g para a 170/25 e 16,57 mg/100g para a 170/23. No entanto, o ácido ascórbico retarda a ação enzimática em um intervalo de tempo, após isto, o mesmo perde sua efetividade devido sua saturação na forma oxidada. Em relação às análises físico-químicas dos sucos, os resultados entre as frutas comerciais e híbridas foram semelhantes entre si. Quanto às análises fenólicas, os resultados de fenóis totais para as nove cultivares híbridas variaram de 2902- 4966 mgEAC/kg para a fruta e 568-1264,3 mgEAC/L para os sucos. Para flavonoides totais os teores oscilaram de 1222-3319 mgECAT/kg para a fruta e 76,7- 277,6 mgECAT/L para o suco. As frutas 170/23 e 170/25 obtiveram os menores resultados tanto para os teores fenólicos, quanto à atividade antioxidante. Quanto ao perfil fenólico das frutas híbridas, houve a quantificação dos principais compostos também presentes em frutas comerciais. No entanto, o principal substrato relacionado à oxidação enzimática e formação de pigmentos escuros, o ácido clorogênico, apresentou um dos maiores teores na híbrida 170/25. A propagação das características de escurecimento enzimático tardio às futuras cultivares de mesa, pode potencializar o mercado de minimamente processados e sucos integrais. Ademais, com a preservação dos compostos fenólicos e sua capacidade antioxidante, há a conservação das características funcionais e sensoriais da maçã e seus produtos.

Palavras-chave: Atividade enzimática, polifenoloxidase, peroxidase, compostos fenólicos, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Apples and their products are important sources of phenolic compounds. When in contact with oxygen, the contents of these compounds, as well as their antioxidant activity, are reduced due to the action of two main enzymes, Polyphenoloxidase (PPO) and Peroxidase (POD), occurring the phenomenon of enzymatic browning. However, there are cultivars of apples from genetic improvements that, even after oxidative stress, have a low browning. The objective of this work was to evaluate the enzymatic browning in apples, with the purpose of investigating the low occurrence of this phenomenon in hybrid cultivars and to evaluate the technological potential of the fruits and their juices. Sixteen (16) apple varieties, among them seven (7) commercial and nine (9) hybrids (derived from the genetic crossing of the cultivars Imperatriz and Primícia), were evaluated in relation to the enzymatic browning. For this, the parameters Chroma, Hue angle and browning index were determined. In the whole fruit, the activity of the PPO and POD, ascorbic acid content and the test of their effectiveness, besides the quantification of the main individual phenolic compounds were determined. For intact fruits and their respective juices, total phenolic and total flavonoid contents were evaluated, as well as their antioxidant activity by DPPH, FRAP and ABTS methods. Physicochemical analyses of pH, titratable total acidity and soluble solids were made in the juices of all fruits studied. Hybrid apples coded as 170/23 and 170/25 obtained the lowest pulp darkening indexes (78.63 and 57.58, respectively), as well as in their juices (4.8 and 4.4, in that order). The cultivars Gala and Maxi Gala presented higher pulp browning (114 and 218, respectively), as well as for the respective juices, with a mean browning index of 384.5. Hybrid apples 170/23 and 170/25 also had lower enzymatic activity, corresponding to the seven commercial cultivars of more expressive browning, only 19% of PPO and 2.3% of POD activities, respectively. In determining the ascorbic acid content, these two cultivars also stood out with the highest levels: 29.95 mg / 100g for 170/25 and 16.57 mg / 100g for 170/23. However, ascorbic acid slows down the enzymatic action in a time interval, after this, it loses its effectiveness due to its saturation in the oxidized form. In relation to the physical-chemical analyses of juices, the results between commercial and hybrid fruits were similar among themselves. As for the phenolic analyses, the total phenol content for the nine hybrid cultivars ranged from 2902- 4966 mgEAC / kg for the fruit and 568-1264.3 mgEAC / L for the juices. For total flavonoids, the contents ranged from 1222-3319 mgECAT / kg for the fruit and 76.7-277.6 mgECAT / L for the juice. The fruits 170/23 and 170/25 obtained the lowest results for both the phenolic contents and the antioxidant activity. As for the hybrid fruits phenolic profile, the main compounds also present in commercial fruits were quantified. However, the main substrate related to enzymatic oxidation and formation of brown pigments, chlorogenic acid, presented one of the highest levels in the hybrid 170/25. The propagation of the characteristics of late enzymatic browning to future commercial cultivars can potentiate the market of minimally processed and whole juices. In addition, with the preservation of the phenolic compounds and their antioxidant capacity, there is the conservation of the functional and sensorial characteristics of the apple and its products.

Keywords: Enzymatic activity, polyphenol oxidase, peroxidase, phenolic compounds, antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção mundial de maçãs.....	15
Figura 2. Produção brasileira de maçãs.	16
Figura 3. Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmico (A) e hidroxibenzóico (B).....	19
Figura 4. Estrutura química do ácido 5- cafeoilquínico.	20
Figura 5. Estrutura química geral dos flavonoides.	22
Figura 6. Estrutura geral dos flavan-3-óis.	23
Figura 7. Estrutura química das procianidinas encontradas em maçãs.	23
Figura 8. Estrutura química geral dos flavonóis.....	24
Figura 9. Estrutura química geral das dihidrochalconas encontradas em maçãs.....	25
Figura 10. Estrutura química geral das antocianinas presentes em maçãs.	26
Figura 11. Reações catalisadas pela enzima PPO e formação de compostos escuros.....	30
Figura 12. Localização das enzimas PPO, POD e substrato fenólico em célula de maçãs.	31
Figura 13. Oxidação de um composto fenólico em presença da enzima POD.....	32
Figura 14. Oxidação do ácido ascórbico em deidroascórbico	34
Figura 15. Índice de escurecimento (IE) da polpa de maçãs comerciais e híbridas ao longo do período de 60 minutos.	51
Figura 16. Sucos no tempo zero e após 60 minutos em exposição ao ambiente	60
Figura 17. Suco de maçã Gala com 30 mg/100g logo após o processamento e após 150 minutos	61
Figura 18. Índice de escurecimento enzimático (IE) para sucos de maçã comerciais e seleções híbridas ao longo de 60 minutos.....	78
Figura 19. Sucos despectinizados oxidados das maçãs comerciais e seleções híbridas 60 minutos após o processamento.	84
Figura 20. Sucos não oxidados e oxidados das cultivares Maxi Gala e Gala.....	84
Figura 21. Suco não oxidado e oxidado da seleção híbrida 170/25.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros cromatográficos dos padrões utilizados.....	44
Tabela 2. Parâmetros físicos das maçãs comerciais e híbridas.....	46
Tabela 3. Parâmetros de cor da polpa de maçãs <i>in natura</i> no tempo zero e após 60 minutos do corte	48
Tabela 4. Índice de escurecimento e atividade enzimática em maçãs comerciais e híbridas...	54
Tabela 5. Teor de ácido ascórbico em maçãs híbridas e comerciais.	57
Tabela 6. Efetividade da concentração de ácido ascórbico em suco de maçã Gala em tempos diferentes de exposição ao ambiente.	59
Tabela 7. Teores fenólicos e atividade antioxidante, em base seca, de maçãs híbridas e comerciais.....	62
Tabela 8. Perfil fenólico de maçãs híbridas e comerciais.....	65
Tabela 9. Resultados físico-químicos dos sucos de maçã oxidados.....	75
Tabela 10. Índice de escurecimento e parâmetros de cor de sucos não oxidados e oxidados após 60 minutos.	81
Tabela 11. Composição fenólica e atividade antioxidante de sucos oxidados de maçã comerciais e híbridas.....	87

LISTA DE SIGLAS

PPO	Enzima Polifenoloxidase
POD	Enzima Peroxidase
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas ao oxigênio)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power (poder antioxidante de redução do ferro)
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
CQA	Ácido clorogênico
CAT	Catequina
PB2	Procianidina B2
QGA	Quercetina-3-O- galactosídeo
QGL	Quercetina-3-O- glucosídeo
QRH	Quercetina-3-O- ramnosídeo
QRU	Quercetina-3-O- rutinosídeo
QAR	Quercetina-3-O- arabinosídeo
QXI	Quercetina-3-O- xilosídeo
PLZ	Floridzina
FXI	Floretina xiloglucosídeo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	13
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1. A maçã.....	15
1.2. A maçã no Brasil	16
1.3. Parâmetros físico-químicos da maçã.....	17
1.4. Os compostos fenólicos da maçã	17
1.4.1. Ácidos Fenólicos	19
1.4.2. Flavonoides	21
1.4.2.1. Flavanóis.....	22
1.4.2.2. Flavonóis.....	24
1.4.2.3. Dihidrochalconas	25
1.4.2.4. Antocianinas.....	26
1.5. O Escurecimento Enzimático	27
1.5.1. Função do sistema enzimático nas células vegetais	27
1.5.2. Enzima Polifenoloxidase (PPO)	28
1.5.3. Enzima Peroxidase (POD)	30
1.5.4. Inibidores do escurecimento enzimático	33
CAPÍTULO 2: ASPECTOS TECNOLÓGICOS DE MAÇÃS COM ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO TARDIO.....	36
2.1. INTRODUÇÃO.....	37
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.2.1. Materiais	38
2.2.2.1 Caracterização e determinação do ponto de maturação das frutas.....	39
2.2.2.2 Determinação do escurecimento enzimático em maçãs <i>in natura</i>	39
2.2.2.3 Determinação da atividade enzimática em maçãs	40
2.2.2.4 Extração dos compostos fenólicos	41
2.2.2.5 Determinação da composição fenólica total das maçãs.....	41
2.2.2.6 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	43
2.2.2.7 Determinação do teor de ácido ascórbico.....	43
2.2.2.8 Teste da efetividade do ácido ascórbico em maçãs.....	44
2.2.2.9 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos individuais.....	44
2.2.2.10 Análises Estatísticas.....	45
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46

2.3.1 Caracterização das frutas <i>in natura</i>	46
2.3.2 Determinação do escurecimento e atividade enzimática na polpa de maçãs	47
2.3.3. Determinação do teor fenólico total e atividade antioxidante em maçãs híbridas e comerciais	61
2.3.4 Identificação e quantificação do perfil fenólico de maçãs	64
2.4 CONCLUSÃO	69
CAPÍTULO 3: ASPECTOS TECNOLÓGICOS DO SUCO DE MAÇÃS COM ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO TARDIO	70
3.1 INTRODUÇÃO	71
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	72
3.2.1 Materiais	72
3.2.2. Métodos	72
3.2.2.1 Processamento dos sucos de maçã.....	72
3.2.2.2 Determinação do escurecimento enzimático em sucos de maçã	73
3.2.2.3 Análises físico-químicas dos sucos de maçã	73
3.2.2.4 Determinação da composição fenólica e atividade antioxidante dos sucos de maçã	74
3.2.2.5 Análises Estatísticas.....	74
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.3.1. Determinação das características físico-químicas dos sucos de maçã.....	75
3.3.2. Determinação do escurecimento enzimático em sucos de maçã	77
3.3.3. Determinação da composição fenólica e atividade antioxidante de sucos de maçã	86
3.4. CONCLUSÃO	90
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91

INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus domestica* L. Borkh) é uma das frutas mais produzidas, a qual apresenta grande importância para a economia mundial devido ao consumo *in natura*. O suco de maçã é o segundo mais consumido no mundo, com o primeiro lugar pertencente ao suco de laranja.

Por ser uma fruta presente durante todo o ano no cotidiano dos consumidores, a maçã é uma interessante fonte de compostos fenólicos e ação antioxidante. Estes, derivados do metabolismo secundário dos vegetais, estão associados ao mecanismo de defesa celular contra fatores bióticos e abióticos. Além disso, contribuem nas características de coloração do fruto, como também na adstringência, amargor e acidez dos mesmos. Quando ingeridos, os ácidos fenólicos e flavonoides, principais classes destes compostos químicos em maçãs, podem estar correlacionados com a diminuição do estresse oxidativo das células, evitando o surgimento de doenças degenerativas, diabetes e células carcinogênicas.

Existem compostos fenólicos que são substratos diretos de ações enzimáticas oxidativas, que culminam no escurecimento enzimático de diversos tipos de alimentos. Entre eles, estão o ácido clorogênico, catequinas, epicatequinas e derivados de dihidrochalconas. As enzimas responsáveis por este fenômeno são a polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD), presentes nos plastos e mitocôndrias da célula, respectivamente. Nos vegetais, possuem a função de evitar o excesso de formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS), como peróxidos e hidroperóxidos, os quais podem causar toxicidade celular. Com a oxidação dos compostos bioativos, específicos ao sítio ativo enzimático, há a formação de pigmentos de cor escura, denominados melanoidinas. Estes pigmentos prejudicam o aspecto sensorial e a função nutricional, com a redução da atividade antioxidante, da fruta e seus produtos. Nos sucos, o escurecimento enzimático torna-se mais evidente, devido à demasiada exposição das células ao oxigênio, além dos principais substratos da enzima ser transferidos à fração líquida, como o ácido clorogênico. No entanto, no processo de sucos de maçã clarificados, a coloração dourada e translúcida, resultante da oxidação fenólica, torna-se atrativa, além do fato da reação derivar aromas quistos ao consumidor final.

O escurecimento enzimático em vegetais pode ocorrer de maneira tardia a partir de modificações no cruzamento entre cultivares. O melhoramento genético de maçãs além de proporcionar a obtenção de seleções avançadas, com maior resistência a doenças e impactos permite derivar frutos com menor velocidade de escurecimento de suas polpas e respectivos sucos. Neste último caso, o consumo de maçãs com escurecimento enzimático tardio torna-se

sensorialmente atrativo ao consumidor, além do fato dos compostos fenólicos não serem oxidados mantendo sua atividade antioxidante. Ademais, a presença de frutas com o escurecimento enzimático tardio no mercado irá potencializar o ramo agroindustrial, com a redução da adição de antioxidantes aos produtos. Além disso, a diversidade de cultivares no mercado irá ampliar escolhas dos consumidores para novas frutas que surgirão em um futuro próximo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de escurecimento enzimático em cultivares diversas de maçãs e seus sucos, correlacionar o fenômeno com a composição dos mesmos e avaliar a aptidão tecnológica destas frutas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o escurecimento enzimático em cultivares de maçãs híbridas, correlacionar com a composição das frutas e analisar sua aptidão tecnológica na agroindústria brasileira.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Avaliar* a atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase em cultivares de maçãs híbridas e comparar com maçãs comerciais;
- *Avaliar e comparar* o teor de ácido ascórbico entre maçãs híbridas e comerciais;
- *Determinar e avaliar* as principais classes fenólicas e a atividade antioxidante da fruta e suco;
- *Identificar* e quantificar o perfil de compostos fenólicos individuais em cultivares de maçãs comerciais e híbridas;
- *Correlacionar* o escurecimento enzimático com a composição da fruta e do suco;
- *Analisar* a aptidão tecnológica em cultivares híbridas de maçãs e seus respectivos sucos.

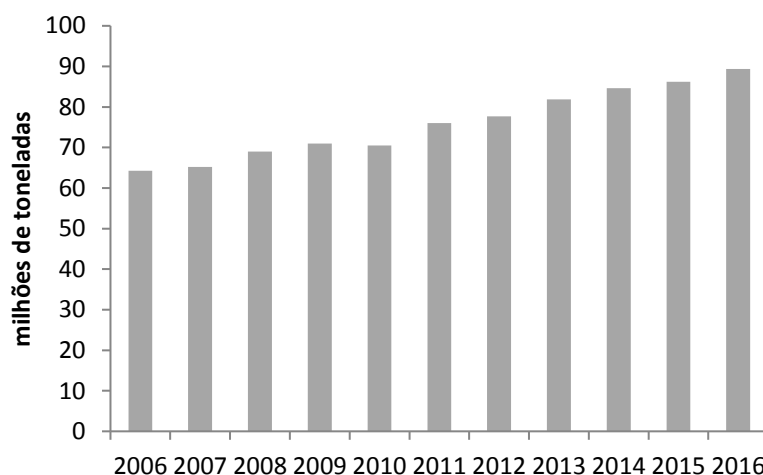
CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. A maçã

A maçã (*Malus domestica* L. Borkh) é uma das frutas mais produzidas no mundo, com aproximadamente 84,6 milhões de toneladas no ano de 2016. Naquele mesmo ano, os principais produtores mundiais de maçã foram a China com 40,9 milhões de toneladas, Estados Unidos com 5,1 milhões de toneladas e Índia com 2,5 milhões de toneladas. Nos últimos anos, há um crescimento significativo na produção mundial de maçãs. A Figura 1 mostra o crescimento na produção da fruta em um período de 10 anos, de acordo com dados da FAOSTAT (2018).

Figura 1. Produção mundial de maçãs.



Fonte: Elaborado pela autora com base nos dados da FAOSTAT (2018).

A macieira é uma planta lenhosa e apresenta bom desenvolvimento em regiões de clima temperado, caracterizado por invernos rigorosos e responsáveis pelo crescimento favorável da frutífera. Pertence à família *Rosaceae*, a qual abrange cerca de 100 gêneros e mais de 2000 espécies ao redor do mundo. Segundo Luchi (2002), o início do cultivo das primeiras espécies de maçã foi há cerca de 20 mil anos, realizado por povos de origem europeia e asiática.

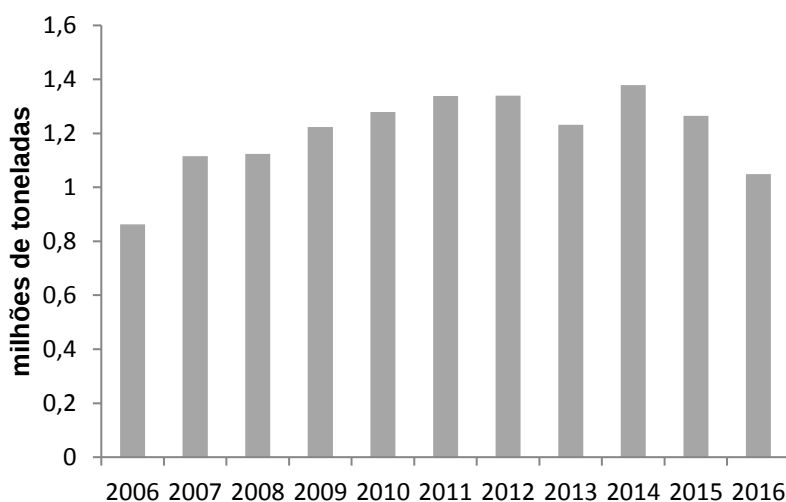
Na produção de maçãs, existe uma fração a qual não atende aos padrões exigidos pelo comércio da fruta *in natura*, devido apresentar irregularidades de tamanho, injúrias, cor, formato e outros aspectos visuais não aceitos pelos consumidores. As maçãs de “descarte”, assim denominadas, constituem aproximadamente 30% de toda a produção e estas são destinadas à produção de sucos e fermentados (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2018).

Além das maçãs de descarte, em diversas regiões do mundo, existe a produção de cultivares voltada apenas para o processamento de sidras e sucos. Estas variedades apresentam resistência maior a pragas e menor custo de produção (WOSIACKI; PHOLMAN; NOGUEIRA, 2004). O tamanho reduzido das maçãs industriais também facilita o manejo durante o transporte, além do fato do tamanho proporcionar teores maiores de açúcares e ácidos, o que são importantes para a produção de sucos e fermentados (RIZZON; BERNARDI; MIELE, 2005).

1.2. A maçã no Brasil

Devido às características climáticas necessárias para o desenvolvimento da macieira, no Brasil, a frutífera teve uma adaptação favorável em regiões de clima mais ameno, com destaque para a serra catarinense e gaúcha na região sul do país (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2018). De acordo com dados da FAOSTAT (2018), no ano de 2016, a produção brasileira de maçã foi de 1,2 milhão de toneladas (Figura 2).

Figura 2. Produção brasileira de maçãs.



Fonte: Elaborado pela autora com base nos dados da FAOSTAT (2018).

No Brasil, os primeiros pomares surgiram no estado de Santa Catarina em 1940 e na década de 50, em São Joaquim, cujo clima favorecia a produção da frutífera. Além do cultivo de outros produtos agrícolas como uva e trigo, iniciou-se naquela época um intenso plantio de maçãs que, a partir de então, passou a ser também responsável pelo crescimento econômico

regional (LUCHI, 2002; ALBUQUERQUE JUNIOR et al., 2010). Todas as cultivares de maçãs conhecidas, as quais são mais de 20 mil, são derivadas de espécies originadas na Ásia e, comercialmente, são encontradas apenas 60 cultivares devido à oferta e procura comercial. No Brasil, segundo dados do ano de 2016 pela ABPM (2019), as cultivares Gala e Fuji são responsáveis por aproximadamente 95% de toda a produção, voltadas principalmente para o comércio *in natura*.

1.3. Parâmetros físico-químicos da maçã

A qualidade de um produto está relacionada com suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Estes parâmetros, tanto para a maçã *in natura* quanto para os produtos derivados da mesma, indicam a qualidade em que se encontra a fruta, fator de exigência do mercado consumidor. A composição de maçãs está relacionada com a cultivar, grau de maturação, fatores climáticos, ambiente e solo de cultivo. Para a produção de sucos, as condições de processamento e armazenamento dos produtos também influenciam na qualidade final dos mesmos (WILL et al., 2008; ZIELINSKI et al., 2014).

Nos parâmetros físico-químicos de composição, o teor de sólidos solúveis engloba os componentes de maior concentração em frutas, os açúcares e ácidos orgânicos. Apresenta uma relação direta com o grau de maturação: conforme o avanço do amadurecimento da fruta aumenta o teor de sólidos solúveis da mesma. Já o teor de acidez está inversamente relacionado com o amadurecimento da maçã: tem seu conteúdo diminuído com o aumento do grau de maturação da fruta. No suco de maçã, um dos principais produtos da fruta, os açúcares redutores, constituem aproximadamente 75% dos açúcares redutores totais, o que indica que a maior fração de açúcares da fruta compreende glicose e frutose, importantes para o processo fermentativo na produção de sidras (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2018).

A alteração da cor da casca de frutas está relacionada com a maturação e consequente redução no conteúdo de clorofila, com a diminuição da cor verde. Além disso, em cultivares vermelhas, a coloração da casca está relacionada com o conteúdo de antocianinas. A mudança da cor da epiderme dos frutos relaciona-se com o aumento do conteúdo de carotenoides, que podem aumentar em até cinco vezes durante a maturação de maçãs (KNEE, 1981; TSAO et al., 2005; VIEIRA et al., 2009).

1.4. Os compostos fenólicos da maçã

Em plantas, existem dois tipos de metabólitos produzidos: os primários e os secundários. Os primários estão relacionados com reações vitais do vegetal, com função ativa nos processos de respiração, fotossíntese e assimilação de nutrientes. Os compostos secundários, por outro lado, estão associados com processos de defesa do vegetal (NASS, 2007). Dentre os metabólitos secundários presentes, encontram-se os compostos fenólicos, os quais são derivados dos aminoácidos fenilalanina e tirosina (ANGELO; JORGE, 2007; SILVA, et al.; 2010). Este grande e complexo grupo de substâncias está inserido nos constituintes de vegetais e frutas, além de produtos industrializados a partir destas matérias primas.

Os compostos fenólicos são essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais devido atuarem contra a ação de micro-organismos, insetos e raios UV, formação da pigmentação da planta, adstringência do fruto, aroma e estabilidade oxidativa, além da ação contra agressões do ambiente externo (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2006; NAPAL et al., 2010; KENNEDY et al., 2011). Na natureza, os fenóis são amplamente distribuídos e mais de 8000 variedades destes compostos estudados em plantas. Englobados desde moléculas simples até as com alto grau de polimerização, estão presentes na forma livre ou ligados a moléculas de glicosídeos e proteínas (BRAVO, 1998; SILVA et al.; 2010).

Na química, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que apresentam um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos. Os grupos funcionais, na estrutura de um fenol, podem gerar variação, diferenciando-o quanto à estrutura e reatividade (LEE et al.; 2005).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada na interação de suas moléculas com espécies radicalares, as quais são consumidas durante a reação. De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes podem ser classificados como primários e secundários (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004). Os antioxidantes primários apresentam como característica de ação a interrupção da reação em cadeia por meio da doação de elétrons aos radicais livres, com a formação de produtos estáveis, cessando a reação oxidativa (BRANDWILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995).

A ação dos fenóis como antioxidantes primários, está na habilidade em doar hidrogênios ou elétrons. Além disso, há uma relação dos seus radicais intermediários estáveis os quais impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995). Os antioxidantes secundários retardam a etapa de iniciação do processo de auto oxidação das moléculas. Isso decorre por mecanismos diversos, os quais incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, formação de moléculas não radicalares, absorção da radiação ultravioleta ou desativação do oxigênio *singlet* (ADEGOKE et al., 1998).

Em maçãs, 97% dos compostos fenólicos estão localizados no vacúolo celular e, em relação a todas as partes da fruta, a maior concentração está em células do epicarpo quando comparadas com células de tecidos vegetais internos (NICOLAS et al., 1994; ZARDO et al. 2009). A classe dos flavanóis compõe os compostos fenólicos mais abundantes em maçãs e contribuem com até 60% do teor fenólico no epicarpo e mesocarpo das mesmas (ALBERTI et al., 2017). Para a diversidade de compostos fenólicos existentes nas maçãs, os grupos mais abundantes são ácidos fenólicos e flavonóides. Para os ácidos fenólicos, destacam-se os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos como maior representante, na fruta, o ácido clorogênico (HRAZDINA; BORZEL; ROBINSON, 1970). São constituintes dos flavonóides os flavanóis (flavan-3-óis), antocianinas, flavonóis e dihidrochalconas (GRAHAM, 1992; VAN ACQUIRE, 1996).

1.4.1. Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos são classificados como o segundo grupo de fenóis de maior importância. São divididos em duas classes de compostos: os ácidos hidroxicinâmicos e os ácidos hidroxibenzóicos (HARBORNE, 1989; ANGELO; JORGE, 2007). Como característica estrutural química, os ácidos hidroxibenzóicos caracterizam-se por apresentar um anel benzeno, um grupo carboxílico, um ou mais agrupamentos hidroxila e/ou grupos metila na molécula. Possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza, porém, em maçãs a quantidade encontrada destes compostos é ínfima (SOARES, 2002; BALASUNDRAM et al., 2006; SILVA, et al., 2010). Apresentam nove átomos de carbono (C_6-C_7) em suas ligações químicas, contudo, sendo mais encontrados na natureza os de sete carbonos.

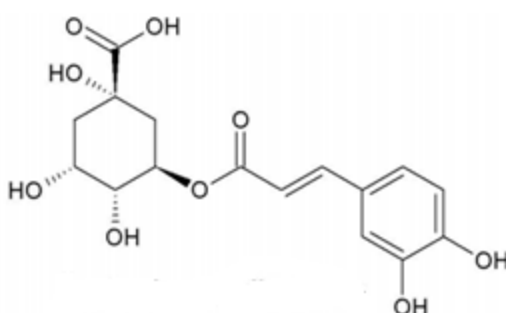
Na maçã, torna-se mais comum a presença de ácido cumárico e cafeico, ambos na forma esterificada a um álcool: ácido cumaroilquínico e ácido 5- cafeoilquínico, comumente chamado de ácido clorogênico. Este é o ácido hidroxicinâmico mais encontrado em maçãs e é o principal substrato da enzima polifenoloxidase (PPO) na reação de escurecimento enzimático (SOARES, 2002). A estrutura básica dos ácidos fenólicos pode ser visualizada nas Figuras 3 e 4.

Figura 3. Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmico (A) e hidroxibenzóico (B).



Fonte: Silva et al. (2010).

Figura 4. Estrutura química do ácido 5- cafeoilquínico.



Fonte: Oliveira; Bastos (2011).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos está relacionada com a posição dos grupos hidroxila e também da proximidade do agrupamento carboxila em relação ao grupo fenil. Quanto mais próximo, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila (HRAZDINA; BORZEL; ROBINSON, 1970).

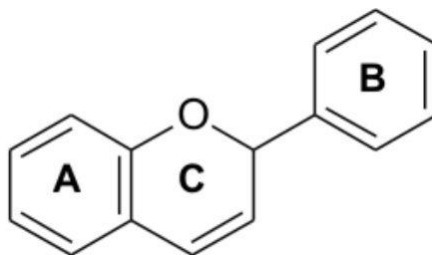
1.4.2. Flavonoides

Os flavonoides são reconhecidos pelo grande potencial bioativo devido à ação antioxidante dos compostos com a diminuição da incidência de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (ERLUND, 2004). Compreendem o grupo de compostos fenólicos mais distribuídos entre os vegetais e estão localizados em folhas, frutos e sementes na forma de glicosídeos ou agliconas (SILVA et al., 2010). A abundância deste composto está relacionada com as inúmeras combinações entre os grupos aglicona e os açúcares, sendo mais comum em maçãs a ligação com a galactose. Contudo, pode ocorrer também a glicosilação entre outros açúcares como ramnose, xilose ou glicose (AWAD; JAGER; VAN WESTING, 2000; ERLUND, 2004).

A estrutura básica dos flavonoides, em geral, é composta de 15 átomos de carbono com configuração C₆-C₃-C₆. Contudo, existem compostos com mais de 15 átomos de carbono em sua estrutura. Em sua estrutura molecular, os flavonoides apresentam a estrutura de difenilpropano, com a presença de dois anéis aromáticos (A e B) unidos por três carbonos, formando um anel heterocíclico (C) (ANGELO; JORGE, 2006; ARON; KENNEDY, 2008). O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/melolato, enquanto o anel B, oriundo da fenilalanina. A substituição de grupos no anel C resulta em diferentes classes de flavonoides: aqueles contendo um grupo hidroxila são classificados como 3-hidroxi flavonoides (flavonóis, antocianinas e catequinas), já os que não possuem são os 3-desoxi flavonoides (flavanonas e flavonas) (MERKEN; BEECHER, 2000; ERLUND, 2004). A estrutura química dos flavonoides pode ser visualizada na Figura 5.

Dentro da classe dos flavonoides, as subclasses diferem entre si de acordo com as modificações na estrutura química como número de insaturações, hidroxilas substituintes e grau de oxidação entre os carbonos da molécula (SPANOS; WROLSTAD, 1992).

Figura 5. Estrutura química geral dos flavonoides.



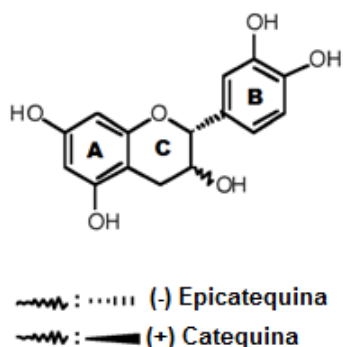
Fonte: Angelo; Jorge (2006).

1.4.2.1. Flavanóis

Os flavanóis são classificados como um amplo grupo de compostos fenólicos os quais incluem os flavan-3-óis. Estes compostos estão envolvidos na proteção da planta contra estresses abióticos (como a luz ultravioleta) ou bióticos, no caso de patógenos (DIXON; STEELE, 1999). Quando ingeridos, os flavan-3-óis apresentam caráter de adstringência ao precipitar proteínas salivares da cavidade oral, associando-os também como taninos condensados (OLIVEIRA et al., 2013). Compreendem nesta classe a catequina, epicatequina e procianidinas (LEE, et al., 2003; ANGELO; JORGE, 2007; OLIVEIRA et al., 2013).

Os compostos fenólicos, da classe dos flavanóis são mais abundantes em maçãs, correspondendo até 20% do total dos mesmos. Dentro desta subclasse, se encontram a (+) catequina e (-) epicatequina, Figura 6 (McGHIE; HUNT; BARNETT, 2005). Apresentam elevada atividade antioxidante e, assim como o ácido clorogênico, são susceptíveis à ação da enzima polifenoloxidase, com o consequente escurecimento enzimático (PODSEDEK, et al., 2000; KIEWNING, et al. 2013).

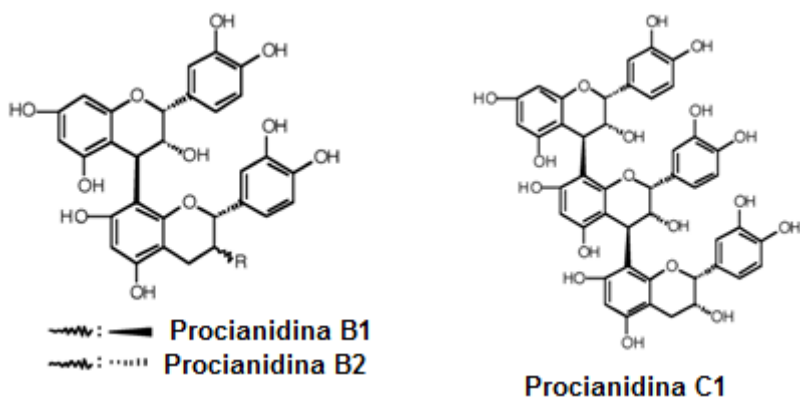
Figura 6. Estrutura geral dos flavan-3-óis.



Fonte: Shoji et al. (2005).

Procianidinas são formadas por ligações entre flavan-3-óis e estão presentes na natureza em uma grande diversidade de estruturas. Isso ocorre devido às características estruturais dos monômeros e também o tipo de polimerização dos mesmos (OLIVEIRA et al., 2013). Nas maçãs, as procianidinas estão presentes na forma de dímeros, como a procianidina B1 (epicatequina-(4 β →8)-catequina), procianidina B2 (epicatequina-(4 β →8)- epicatequina), procianidina B5 (epicatequina-(4 β →6)-epicatequina) e o na forma do trímero C1 (epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina) (Figura 7) (SHOJI et al., 2005).

Figura 7. Estrutura química das procianidinas encontradas em maçãs.



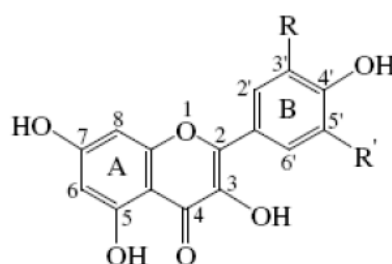
Fonte: Shoji et al. (2005).

1.4.2.2. Flavonóis

Os compostos fenólicos da subclasse dos flavonóis encontram-se principalmente no epicarpo dos frutos. Apresentam função de regular a textura dos mesmos, inibindo a ação da enzima β -galactosidase (VAN DER SLUIS et al., 2001). A estrutura química é constituída por uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 e, no anel do núcleo, apresenta uma hidroxila na posição 3 e uma carbonila na posição 4, como pode ser observado na Figura 8 (SHI; MAZZA; MAGUER, 2002). São exemplos desta subclasse os compostos quercetina, miricetina e kaempferol. Na maçã, os flavonóis encontram-se na forma de glicosídeos de quercetina, principalmente na forma de quercetina-3- β -D-galactosídeo. Este composto, também denominado de hiperosídeo, é o principal flavonol encontrado em maçãs (BEHLING et al., 2004).

A glicosilação é um mecanismo químico que pode afetar na absorção do composto. A quercetina-3- rutinosídeo, rutina, é amplamente encontrada em alimentos, contudo, apenas 20% da mesma é biodisponível. Há a possibilidade, então, de uma hidrólise na molécula de ramnose, transformando-a em quercetina-3- glicosídeo, com uma alta biodisponibilidade. Isso ocorre pela existência de microbiotas no organismo as quais possuem glicosidases capazes de hidrolisar estes compostos com alta especificidade (CRESPY et al., 1999).

Figura 8. Estrutura química geral dos flavonóis.



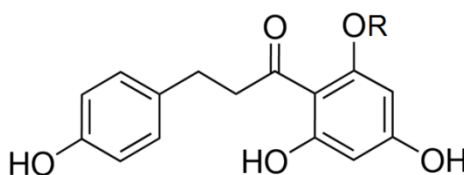
Fonte: Shi; Mazza; Maguer (2002). Nota: Para quercetina, R= OH, R'= H; Para miricetina, R=R'=OH; Para Kaempferol, R=R'=H.

1.4.2.3. Dihidrochalconas

As dihidrochalconas constituem a classe de compostos fenólicos distribuídas por toda a fruta (TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000). Alberti et al. (2017) observaram altos teores de dihidrochalconas no epicarpo de maçãs da cultivar Eva em todos os estágios de desenvolvimento: fruta imatura, madura e senescente. Contudo, maçãs das cultivares Gala e Fuji Suprema tiveram os teores de dihidrochalconas reduzidos conforme o avanço do amadurecimento.

Os principais compostos desta classe fenólica são a floretina (floretina 2'-β-D-glicosídeo) e floridzina (floridzina 2'-β-D-xilosil-(1→6)-β-D-glicosídeo) e possuem seus teores variáveis de acordo com a cultivar da maçã (LU; FOO, 1997) (Figura 9).

Figura 9. Estrutura química geral das dihidrochalconas encontradas em maçãs.



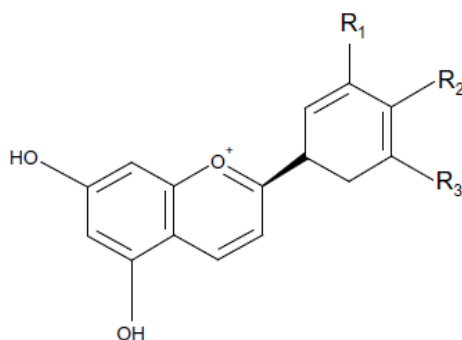
Fonte: Sigma-Aldrich (2017). Nota: Floretina para R=H e Floridzina para R= glicose.

Esta subclasse de compostos fenólicos é característica da maçã *in natura*, de seus produtos (suco, sidra, bagaço) e a presença de floridzina nos mesmos torna-se um biomarcador da família *Rosaceae*, a qual abrange a maçã (TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000; ALBERTI et al., 2017). Devido a isso, existem técnicas adequadas para monitorar a adulteração de produtos baseado na presença ou não de floridzina (LU; FOO, 1997; BURDA et al., 1998; TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000). Em sementes de maçãs, do total do teor de compostos fenólicos, 60% correspondem à subclasse das dihidrochalconas, enquanto que aproximadamente 3% se encontram no epicarpo e mesocarpo do fruto (GUYOT, et al., 1998). Segundo Tomás- Barberán e Clifford (2000), durante o consumo da maçã *in natura*, as sementes são descartadas, assim, a maior parte das dihidrochalconas não é ingerida. Além disso, o hábito de descascar as frutas reduz ainda mais o aproveitamento destes compostos.

1.4.2.4. Antocianinas

Antocianinas pertencem à classe de flavonoides que contribuem para a cor vermelha, azul e roxa em flores e epicarpo dos frutos. Nas flores, estes pigmentos atraem polinizadores e, nas frutas, animais dispersantes de sementes (TAKOS et al., 2006). Em maçãs, as antocianinas estão presentes em baixos teores e, geralmente, restritas à casca (CHEYNIER, 2005; VIEIRA et al., 2009). Estes compostos estão na forma glicosilada como cianidina-3-rutinosídeo, malvidina-3-glicosídeo, malvidina-3,5-diglicosídeo e cianidina-3-galactosídeo, sendo esta última a mais predominante em maçãs vermelhas, (ALONSO-SALCES et al., 2001; TSAO et al., 2005). A estrutura química geral das antocianinas presentes nas maçãs pode ser observada na Figura 10.

Figura 10. Estrutura química geral das antocianinas presentes em maçãs.



Fonte: Silva *et al.* (2010). Nota: Cianidina para R1=H, R2= OH e R3= H; Malvidina para R1, R2 e R3= OCH₃.

1.5. O Escurecimento Enzimático

Frutas e hortaliças com aspectos sensoriais, fissuras, formatos ou coloração indesejados constituem um dos motivos de perdas pós-colheita por serem rejeitados pelo consumidor. Em maçãs, cerca de 30% da produção é descartada e destinada ao processamento (SILVA et al., 2009; WOSIACKI; NOGUEIRA, 2018). Na produção de sucos, sidras ou minimamente processados, a maçã é muito susceptível ao escurecimento enzimático, o qual é responsável pelo escurecimento do vegetal e diminuição na qualidade do produto (CHITARRA, 2002). Este fenômeno ocorre pela oxidação de compostos fenólicos pela ação das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD). Nas frutas, o escurecimento pode ocorrer durante a colheita, transporte, ou quando são submetidos a operações unitárias de redução de tamanho no processamento (NICOLAS, 1994; MIDLULI, 2005).

Os impactos mecânicos as quais as frutas são submetidas durante o processamento resultam no aumento da atividade metabólica das células, aumento da respiração, produção de etileno e atividade enzimática, os quais são mecanismos de autodefesa do vegetal (MITTLER, 2002).

Por mais que o escurecimento enzimático tenha resultados negativos para a qualidade sensorial, funcional e nutricional de frutos e seus produtos, para algumas matérias-primas, o fenômeno é fundamental para atribuição de características específicas dos produtos. Este caso ocorre na formação de cor e aromas em passas, cacau e chás fermentados além do desenvolvimento do sabor, pois reduz significativamente a adstringência do produto (SANDERSON, 1964; REEVES et al., 1988; SEO; SHARMA; SHARMA, 2003).

1.5.1. Função do sistema enzimático nas células vegetais

O oxigênio, presente na atmosfera, é produto do processo da fotossíntese. No entanto, quando está presente em excesso nas células, ocorrem danos nos sistemas aeróbicos devido à formação de espécies reativas ao oxigênio (*reactive oxygen species*- ROS), as quais podem reagir com todos os compostos bioquímicos, ocorrendo toxicidade e morte celular (BARTOSZ, 1997). A produção de espécies reativas ao oxigênio ocorre quando parte dos elétrons da cadeia respiratória, no processo de respiração celular, se esquivam do sistema e há uma redução do oxigênio molecular, O₂. São exemplos de ROS's, o peróxido de hidrogênio, H₂O₂, e o radical hidroxila, OH (MITTLER, 2002). Estes compostos estão em alta concentração em cloroplastos

e mitocôndrias, devido ao intenso fluxo de elétrons nas organelas participantes da fotossíntese e respiração celular, respectivamente (GILL; TUTEJA, 2010).

Com o processo evolutivo, organismos aeróbicos se adaptaram ao risco apresentado pela reatividade com o oxigênio. Houve a formação de um sistema antioxidante em defesa do vegetal, com diminuição dos danos celulares ocasionados pelas ROS's (KHAN; WILSON, 1995). Quando o vegetal é exposto a um estresse biótico ou abiótico, o mesmo tem seu metabolismo acelerado com um aumento na taxa respiratória e, também, aumento das ROS's, como os radicais hidroxila e peróxido. Este último, após a submissão do estresse, pode ter uma alta concentração intracelular em aproximadamente 13 minutos (JACKS; DAVIDONIS, 1996; DAVAR et al., 2013). Para evitar a toxicidade destes compostos, as organelas celulares dos vegetais, cloroplastos e mitocôndrias, apresentam um sistema de proteção antioxidante. Neste sistema compreendem enzimas e moléculas não enzimáticas como carotenoides, ácido ascórbico e flavonoides (HU et al., 2009; DAVAR et al., 2013).

O complexo enzimático no interior da célula vegetal tem importância no processo de defesa da planta contra insetos e fitopatógenos. Quando ocorre o ataque de insetos, as enzimas das células vegetais formam eletrólitos que dificultam a absorção de nutrientes pelo animal. Além disso, a presença das enzimas polifenoloxidasas (PPO) leva à oxidação de compostos fenólicos e formação de quinonas. Estes compostos podem alquilar o nucleófilo de aminoácidos (lisina, histidina, cisteína e metionina) de proteínas, tornando-o o vegetal indigerível pelos insetos (BHONWONG et al., 2009). A não digestibilidade de quinonas por insetos foi observada por Felton et al. (1989), os quais submeteram larvas de *S. exidua* a uma dieta rica em ácido clorogênico e PPO.

1.5.2. Enzima Polifenoloxidase (PPO)

A enzima polifenoloxidase (1,2 benzenodiol: oxigênio óxido-redutase) também é classificada como tirosinase, polifenolase, fenolase, catecoloxidase, cresolase ou catecolase. É responsável pelo escurecimento enzimático nos frutos e vegetais pela oxidação de compostos fenólicos (NICOLAS, 1994). Este grupo de enzimas pertence à classe das oxirredutases, as quais catalisam reações de oxido-redução e o substrato oxidado é doador de hidrogênio ou elétron, como os compostos fenólicos. Apresentam pouca especificidade em relação ao seu substrato, no entanto, como são oriundas de diversas fontes bioquímicas, sua atividade relativa difere-se diante de substratos específicos (SIMPSON et al., 1997; SILVA, 2004).

Em vegetais, a PPO não é exclusiva a uma única organela. Tem sua atividade diferenciada de acordo com a espécie, cultivar, estágio de maturação e idade do vegetal (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). Em maçãs, encontram-se presentes nas mitocôndrias e cloroplastos, com atividade mais elevada em frutos jovens e após injúrias mecânicas ao fruto (HAREL; MAYER; SHAIN, 1964; YORUK; MARSHALL, 2003).

O principal substrato da PPO, em maçãs, é o ácido 5- cafeoilquínico, comumente chamado de ácido clorogênico. Este composto fenólico, após uma sequência de reações formadas pela enzima fenilalanina amônia-liase, é sintetizado e glicosilado no retículo endoplasmático e, assim, transportado em vesículas ao vacúolo celular e membranas. Na presença de oxigênio molecular, O_2 , é oxidado à clorogenoquinona (MATHEIS, 1983; HRAZDINA; WAGNER, 1985; MATEOS et al., 1993).

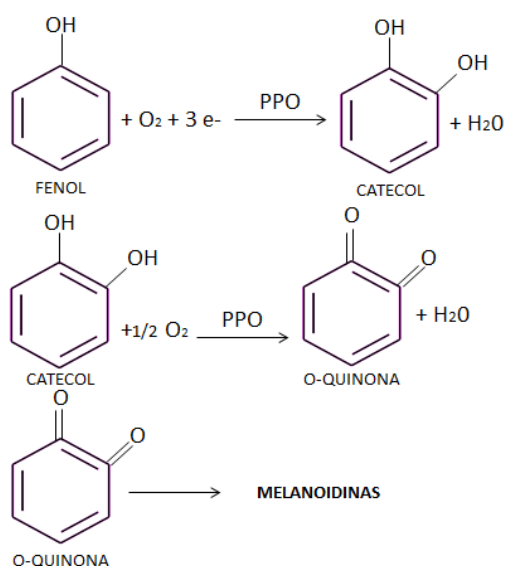
De acordo com Takeo (1965), catequinas também são substratos interessantes para a polifenoloxidase, os quais também estão presentes em maçãs. Segundo o estudo do mesmo autor, os compostos fenólicos (+) catequina, (-) epicatequina e (-) epigalocatequina galato foram efetivamente oxidadas pelas enzimas da matriz estudada. Em maçãs, há uma oxidação mais rápida das catequinas do que do ácido clorogênico, contudo, como este composto se encontra em maiores concentrações na fruta do que a catequina, o seu efeito na reação de escurecimento enzimático é mais evidente (GOUPY et al., 1995; ROCHA; MORAIS, 2001). Em estudos baseados na coloração de sucos de maçã e sidras, Le Deun et al. (2015) constataram que as dihidrochalconas são precursores da oxidação enzimática com a formação de compostos amarelos em sucos. De acordo com os autores, o produto derivado da oxidação enzimática da floretina xiloglicosídeo foi identificado como xiloglucose análoga ao pigmento da oxidação da floridzina, influenciando na cor escura dos sucos.

O processo oxidativo catalisado pela PPO pode ocorrer pela hidroxilação de monofenóis a o-difenóis, atividade cresolase ou monoxigenase, ou pela oxidação de o-difenóis a o-quinonas, atividade catecolase ou difenoloxidase (Figura 11) (MATHEW; PARPIA, 1971; LERNER et al; 1972). Segundo Wilcox et al. (1985), o processo de oxidação enzimática inicia-se com o centro ativo da PPO a qual contém dois íons Cu^+ e estes possuem resíduos do aminoácido essencial histidina. No processo de ligação com o monofenol, no meio oxigenado, os íons Cu^+ se oxidam Cu^{++} , com a formação do complexo enzima-substrato em uma ligação fortemente polarizada. Esta polarização irá gerar uma hidroxilação à molécula de monofenol, transformando-o em um difenol. O oxigênio molecular, O_2 , é responsável pela oxidação do difenol a quinona e, assim, termina o processo enzimático.

As quinonas, compostos amarelados e altamente instáveis, reagem quimicamente entre si e formam polímeros de alta massa molar e insolúveis, as melaninas ou melanoidinas. Podem formar complexos com aminoácidos ou proteínas e oxidar compostos químicos de baixo potencial de oxi-redução (NICOLAS, 1994). O processo do escurecimento enzimático pode ser visualizado na Figura 11.

As melanoidinas são responsáveis pela tonalidade escura da polpa ou suco de maçã após a reação enzimática da PPO e química das quinonas. O processo de escurecimento enzimático acarreta modificações nas características sensoriais do produto, além de reduzir a atividade antioxidante do mesmo (ROCHA; MORAES, 2001).

Figura 11. Reações catalisadas pela enzima PPO e formação de compostos escuros.



Fonte: Adaptado de Polesel; Sinhorini; Perone (2010).

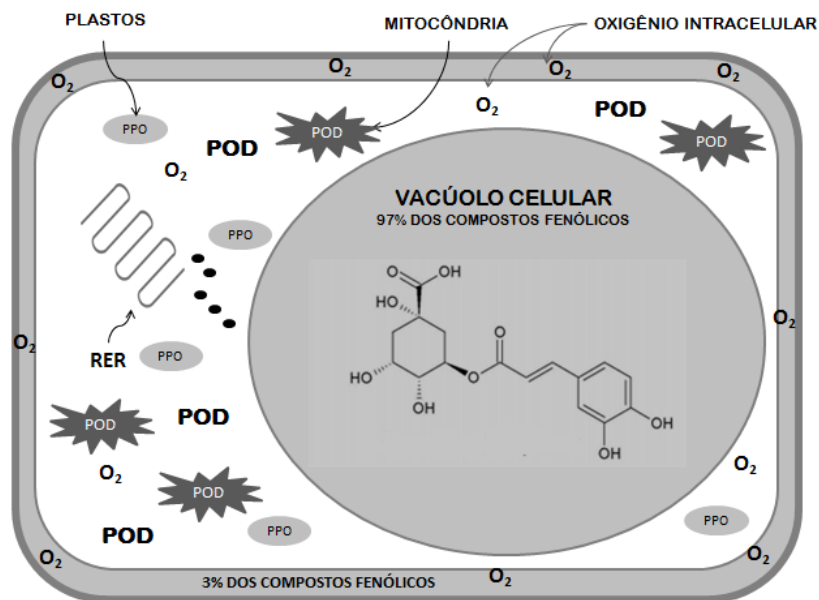
1.5.3. Enzima Peroxidase (POD)

A classe de enzima das peroxidases, POD, (E.C. 1.11.1.7) também é responsável pela oxidação de compostos fenólicos em presença do peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , o qual é uma espécie reativa ao oxigênio, ROS. Em baixas concentrações nas células vegetais, o peróxido de hidrogênio atua de maneira positiva, como chave reguladora de processos fisiológicos de senescência, fotorrespiração e fotossíntese, com auxílio no crescimento e desenvolvimento celular (HIRAGA et al., 2001; BRIGHT et al., 2006). Além da oxidação de compostos, em

vegetais, as enzimas POD participam de processos fisiológicos de reticulação da parede celular, lignificação e proteção contra estresses bióticos e abióticos (SILVA et al., 2009; NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014). O processo de degradação de alimentos, em sua maior parte, é ocasionado pela reação da POD como clareamento ou escurecimento de produtos, além de mudanças indesejadas de textura (ROBINSON; ESKIN, 1991; SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2008).

A estabilidade da peroxidase depende da sua forma, solúvel ou insolúvel, assim como a presença de compostos ligantes, como açúcares que atuam em seu sítio ativo. Desta maneira, a peroxidase contém em sua estrutura 18-37% de carboidratos, classificando-se como uma glicoproteína (THONGSOOK; BARRETT, 2005; CONSTANTINOVICI et al., 2009). Em células vegetais, as enzimas peroxidases estão presentes no interior de mitocôndrias, as quais tem um fluxo intenso de oxigênio, além de estarem distribuídas pelo citoplasma (MITTLER, 2002). A ilustração de uma célula vegetal com suas principais organelas, enzimas oxidantes e substrato pode ser visualizada na Figura 12.

Figura 12. Localização das enzimas PPO, POD e substrato fenólico em célula de maçãs.

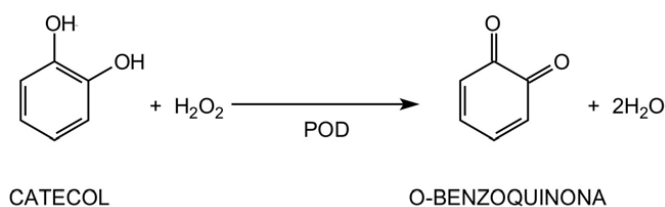


Nota: PPO=Polifenoloxidase, POD=Peroxidase, RER= Retículo Endoplasmático Rugoso. Fonte: adaptado de Toivonen; Brummell (2008).

A complexidade estrutural da enzima POD confere uma alta resistência e estabilidade em altas temperaturas. É utilizada como indicador de eficiência em processos térmicos, pois se estas enzimas forem inativadas, outras relacionadas à qualidade e menos resistentes também

serão. A POD apresenta aplicação como índice de branqueamento adequado em frutas e hortaliças devido sua alta concentração em tecidos vegetais, além da facilidade de análise. Contudo, a dependência da enzima POD como indicador pode gerar um excesso de tratamento térmico e perda da qualidade nutricional e sensorial do produto (ANTHON; BARRET, 2002; SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2008). A ação oxidativa das enzimas peroxidases ocorre de maneira semelhante às polifenoloxidasas. Em presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são obtidas quinonas altamente instáveis, as quais se polimerizam e formam, também, melanoidinas como produto final (Figura 13) (CHITARRA, 2002).

Figura 13. Oxidação de um composto fenólico em presença da enzima POD.



Fonte: Chitarra (2002).

As enzimas POD apresentam em sua estrutura um grupo não proteico formado por íons de ferro (Fe^{3+}). Durante o processo catalítico, o peróxido de hidrogênio oxida o íon Fe^{3+} em estados de maior valência (Fe^{4+} ou Fe^{5+}). Estes possuem alto potencial oxidante, reduzindo-se instantaneamente quando o substrato orgânico da peroxidase é oxidado, neste caso, um composto fenólico (RICHARDSON; HYSLOP, 2000). Subramanian et al. (1999) ressaltaram que, no interior de células vegetais, a concentração de peróxido de hidrogênio é pequena, o que limita a atividade enzimática. Devido a este fato, o envolvimento da POD está relacionado com processos metabólicos lentos, como o escurecimento interno de frutas.

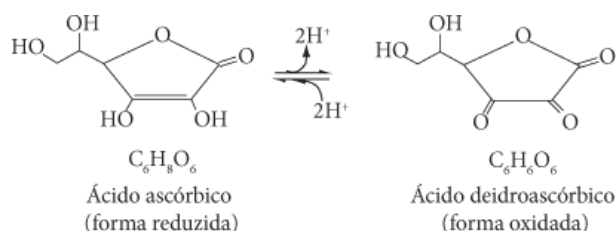
1.5.4. Inibidores do escurecimento enzimático

Na maioria dos métodos de processamento de alimentos, o escurecimento enzimático ocasionado pela atividade da PPO e POD, é indesejável pela perda de características funcionais e sensoriais do produto final (LAURILA; KERVINEN; AHVENAINEN, 1998). Devido a isso, várias formas de inibição enzimática são conhecidas, como adição de antioxidantes, quelantes, redutores e compostos competitivos ao substrato da enzima. Industrialmente, para evitar o escurecimento enzimático nos alimentos, há a adição de componentes, durante a formulação, que devem ser atóxicos, inodoros, incolores e insípidos, além de serem permitidos na legislação, somado com a fácil aplicação e baixo custo do aditivo (RAMALHO; JORGE, 2006)

Inibidores redutores, atuantes no complexo enzima/substrato, possuem o método de controle do escurecimento enzimático mais efetivo (OSUGA et al., 1994). Um dos principais antioxidantes utilizados no processamento de frutas e hortaliças é o ácido ascórbico (vitamina C), com a finalidade de diminuir o escurecimento enzimático e outras reações oxidativas, além de contribuir para o valor nutricional dos alimentos (WILEY, 1994; RAMALHO; JORGE, 2006; SILVA et al., 2009). Em estudos realizados por Chow et al. (2011), a adição de ácido ascórbico, na concentração de 17,6 mg/100g, em maçãs industriais, reduziu a atividade da enzima PPO resultando em apenas 4% de sua ação.

Como um dos modos de ação, o ácido ascórbico pode agir diretamente na estrutura da PPO e POD, complexando o cobre ou ferro da porção não proteica e, assim, inibir as enzimas. As quinonas também podem ser reduzidas a compostos fenólicos, sendo estes estáveis e incolores (SAPERS; MILLER, 1998). A oxidação irreversível do ácido ascórbico ocorre quando as quinonas são transformadas em seus oriundos compostos fenólicos, com a formação do ácido dehidroascórbico (Figura 14). A eficiência deste agente antioxidante pode ser potencializada com a combinação de outros compostos como cloreto de cálcio, sais de sulfito e cisteína (REIS et al., 2004; MELO; VILAS BOAS, 2006).

Figura 14. Oxidação do ácido ascórbico em deidroascórbico



Fonte: Toralles et al. (2008)

A inativação enzimática pode ocorrer pela modificação do pH do meio. Este, quando muito ácidos ou alcalinos, provocam a desnaturação proteica e inativação enzimática. Em maçãs, os ácidos presentes na composição da fruta são o ácido cítrico, málico, ascórbico e fosfórico. São responsáveis por manter o pH do meio abaixo do ótimo da ação enzimática (ZEMEL et al., 1990). O pH ótimo de ação da PPO e POD varia de acordo com a fonte e substrato disponível, mas, geralmente se encontra na faixa de 4,0-8,0 (WESCHE-EBELING; MONTGOMERY, 1990). Contudo, em maçãs, o pH ótimo da PPO está na faixa de 3,5-4,5 e, para a POD, 4,5 (MARQUES et al., 1995; SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2008). Com a diminuição do pH do meio, são afetados os grupos ionizáveis da estrutura enzimática. Estes devem estar em ligações iônicas apropriadas para manter a conformação do sítio ativo enzimático e reconhecer substratos. Geralmente é reversível a mudança no grau de ionização das enzimas, no entanto, quando são submetidas em condições de pH extremo são desnaturadas e pode afetar também a estabilidade dos substratos (LAURILA; KERVINEN; AHVENAINEN, 1998).

O ácido cítrico, além de diminuir o pH, pode agir como um agente quelante na estrutura enzimática. As enzimas PPO e POD apresentam um átomo de cobre e ferro em seus centros ativos, respectivamente. O agente quelante tem a finalidade de se ligar a estes átomos metálicos, eliminando-os do centro ativo das enzimas e ocasionar sua inativação (YORUK; MARSHALL, 2003).

Os compostos fenólicos presentes em maçãs, em particular os derivados de ácidos cinâmicos, como o ácido cafeico, ferúlico e cumárico, apresentam um alto potencial antioxidante. Estes são eficientes na inibição ou delonga das reações de escurecimento enzimático, pois possuem elevada capacidade em doar elétrons e também quelar os íons metálicos das estruturas enzimáticas (RICE-EVANS, et al. 1997; LIN et al., 1998).

No processamento de alimentos, a refrigeração é uma técnica tradicional para diminuir a atividade das enzimas PPO e POD. As temperaturas nas quais frutas e hortaliças são expostas,

de 0-4°C, estão muito distantes da temperatura ótima da ação enzimática. Para maçãs, a temperatura ótima de ação destas enzimas é 30 °C (ZHOU et al., 1993). Assim, em temperaturas baixas, o complexo enzima-substrato é dificultado pela diminuição da energia cinética das ligações químicas (LEE et al., 1995). No armazenamento de frutas e hortaliças, além das baixas temperaturas das câmaras de refrigeração, utiliza-se a tecnologia de atmosfera modificada. Na comercialização, a tecnologia é acoplada em embalagens com concentração de Oxigênio molecular (O₂) reduzida, retardando o processo de escurecimento enzimático interno dos vegetais (CHITARRA, 2002; SILVA et al., 2009).

O uso de novas tecnologias como a irradiação de vegetais e melhoramento genético tem a finalidade de minimizar as atividades das enzimas PPO e POD. No processo de irradiação, além da eliminação de microrganismos, há a inativação das enzimas responsáveis pelo escurecimento enzimático e de outros processos oxidativos dos alimentos. Já o melhoramento genético, possibilita inativar genes que codificam a enzima PPO e POD com a produção de cultivares de frutas e hortaliças menos propensas ao escurecimento (MARTINEZ e WHITAKER, 1995; OLSON, 1998).

Para as maçãs, nos últimos anos, o interesse por novas cultivares vem se ampliando. O melhoramento genético pode proporcionar a obtenção de genótipos resistentes a pragas e doenças do fruto e planta, potencialmente importantes para minimizar os custos de produção e diminuir a aplicação de insumos agrícolas, além de melhorar a qualidade nutricional e aspectos sensoriais da fruta (FURLAN et al., 2010).

CAPÍTULO 2

ASPECTOS TECNOLÓGICOS DE CULTIVARES DE MAÇÃS COM ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO TARDIO

2.1. INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus domestica* Borkh), assim como a maioria dos frutos, é altamente susceptível ao escurecimento enzimático devido sua estrutura e composição fenólica. Composição esta que possuem componentes específicos para a ação oxidativa enzimática (MACHEIX; FLEURIET; BILLET, 1990; LE DEUN et al., 2015; FÉVRIER et al., 2017). A intensidade do escurecimento devida à complexa interação da atividade da enzima polifenoloxidase (PPO), na presença do oxigênio molecular (O_2) com a concentração dos compostos fenólicos que são substratos da mesma (MATHEW; PARPIA, 1971; CHENG; CRISOSTO, 1995; ALBERTI et al., 2014).

Os compostos fenólicos, em maçãs, possuem um teor médio de 450 mg/kg no fruto intacto e, em função da biodisponibilidade, tornam-se uma interessante fonte de compostos antioxidantes (CEYMANN et al., 2012). O teor destes compostos depende da cultivar, estágio de maturação e ambiente de cultivo. Quando consumidos com frequência, conferem benefícios, como a diminuição da incidência de doenças neurodegenerativas, cardíacas, diabetes e câncer (SHAHIDI, 2012; ZHAO et al., 2013).

Para além dos benefícios à saúde, os compostos fenólicos atuam contra o processo oxidativo nos alimentos, como também na propagação de aromas, gosto amargo e sabor adstringente em bebidas de frutas (CARVALHO et al., 2010; FERRETI; TURCO; BACCETTI, 2014). Além da modificação visual da polpa das frutas, o escurecimento enzimático ocasiona uma diminuição de 20 a 60% do teor fenólico, com a consequente diminuição da atividade antioxidante da matriz (GOUPY et al. 1995; ROCHA; MORAIS, 2001; LE DEUN et al., 2015; FÉVRIER et al., 2017).

Em modificações genéticas e cruzamentos entre cultivares de maçãs, a pesquisa permitiu avanços agronômicos com desenvolvimento de plantas adaptadas a condições climáticas e menos susceptíveis a fitopatógenos (FURLAN et al., 2010). Além do mais, permitiu o surgimento de maçãs com escurecimento enzimático tardio ou ausência de escurecimento, possibilitando ao fruto sofrer um estresse mecânico, durante o processamento, e a polpa permanecer inalterada em relação à cor, durante horas (ERCOLI et al., 2017).

O objetivo deste capítulo visa avaliar o escurecimento enzimático em maçãs híbridas, assim como as variáveis responsáveis pelo fenômeno, comparando com frutas comerciais. Assim, frutos com menor taxa ou ausência de escurecimento enzimático podem ser opções em potencial para às indústrias de minimamente processados e sucos de frutas, gerando um apelo sensorial e nutricional, com a cor e atividade antioxidante quase inalterada.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Materiais

Maçãs das cultivares Maxi Gala, Monalisa, Elenise e as 9 seleções híbridas, desenvolvidas no programa de melhoramento genético da macieira da EPAGRI (códigos 170/23, 170/25, 170/30, 170/32, 170/40, 170/91, 170/114, 170/116 e 170/118), foram cedidas pela empresa localizada no município de Caçador (26°50'11,68" S 50°58'23,41"O, 947 m acima do nível do mar) em Santa Catarina, Brasil. As cultivares comerciais Monalisa e Elenise também foram desenvolvidas e lançadas pelo programa de melhoramento genético da EPAGRI. Quanto às híbridas da série 170, são frutas resultantes de cruzamentos entre duas cultivares comerciais, Imperatriz e Primícia. O número '170' indica a quantidade de cruzamentos realizados para obter a cultivar em estudo e o número após esse código, indica a planta selecionada para realização do enxerto e obtenção da variedade final. A princípio, o cruzamento foi realizado com o intuito em selecionar híbridas com arquitetura de ramos mais abertos de suas folhagens, no entanto, foi observado pelos pesquisadores um escurecimento tardio dos frutos resultantes.

As cultivares de mesa Gala, Fuji, Red Delicious e Granny Smith foram obtidas no comércio local da cidade de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Para as análises químicas, os reagentes utilizados foram Folin-Ciocalteu, Trolox (6 -hidroxi - 2,5,7,8 - tetrametilcromano - 2-ácido carboxílico), TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina), DPPH (2,2- difenil-2-picrilhidrazil), ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-ácido sulfônico) e ácido ascórbico fornecidos pela Sigma- Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os solventes para extração de compostos fenólicos foram metanol 99,8% e acetona 99,5% (REATEC, Brasil). Foram utilizados como padrões para perfil fenólico o ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico), ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido gálico, floridzina, floretina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina B2, quercetina, quercetina-3-D-galactosídeo, quercetina-3-β-D-glicosídeo, quercetina-3-o-ramnosídeo e quercetina-3-rutinosídeo, quercetina-3-O-arabnofuranosídeo da Sigma-Aldrich. Para a determinação da atividade enzimática, foram utilizados polivinilpirrolidona (PVP) e pirocatecol 99%, também adquiridos pela Sigma-Aldrich, soluções de Lugol 2% (NEWPROV, Brasil), Guaiacol 0,5% (TEC-LAB, Brasil) e peróxido de hidrogênio 3% (FARMAX, Brasil). Para congelamento das amostras, foi utilizado nitrogênio líquido 99% (Stirling Criogenia, Índia). As soluções aquosas para análises cromatográficas foram preparadas com água ultra pura (Milli-Q, Millipore, Brasil).

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Caracterização e determinação do ponto de maturação das frutas

Previamente ao início das análises, as dimensões (altura e diâmetro), assim como a massa de uma amostra de 10 frutas *in natura* foram obtidos. Em seguida, foi realizada a determinação da umidade das maçãs por análise gravimétrica. Nesta, aproximadamente 5 g de amostra foram adicionadas em cadinhos de alumínio e estes levados até a estufa (NOVA ÉTICA, Brasil) a 105°C até peso constante (IAL, 2008).

O ponto de maturação de todas as maçãs foi determinado pelo teste de iodo-amido, com a utilização de uma solução de Lugol 1% (BLANPIED; SILSBY, 1992). Esta solução foi colocada previamente em placas de Petri e as maçãs, cortadas ao meio no plano equatorial, foram colocadas sob a solução, de maneira que a superfície cortada ficasse totalmente em contato com a solução de iodo-amido. Com base no método proposto por Blanpied e Silsby (1992), foi possível determinar o estágio de maturação das frutas, o qual foi estabelecido como maturação plena, na escala 6,0-7,0 da referência.

2.2.2.2 Determinação do escurecimento enzimático em maçãs *in natura*

Para a determinação do escurecimento enzimático na polpa das frutas, foi realizado de acordo com os métodos adaptados de Persic et al. (2017) e Cefola et al. (2012). As frutas foram cortadas horizontalmente ao meio e a fração correspondente ao pedúnculo imediatamente foi analisada em colorímetro (CM-5-ID, KONICA MINOLTA, Osaka, Japão). Os parâmetros obtidos foram L*, o qual determina a luminosidade, a* as coordenadas de verde a vermelho e b*, coordenadas de azul a amarelo. Nos primeiros 10 minutos, momento em que a atividade enzimática é mais acentuada em maçãs de mesa, a medição dos parâmetros de cor ocorreu em um intervalo de 30 segundos. Após os primeiros 10 minutos, a análise foi realizada a cada 5 minutos até a estabilização dos parâmetros, durante 60 minutos.

Com os valores de L*, a* e b*, foi possível calcular o índice de escurecimento ou *Browning Index (BI)* (CEFOLA et al., 2012) de cada cultivar, de acordo com a equação abaixo:

$$x = \frac{at+1,75Lt}{5,645Lt+a0-3,012bt} \quad (1)$$

Substituindo (1), na equação (2), tem-se:

$$BI = 100 \left(\frac{x-0,31}{0,17} \right) \quad (2)$$

t = valor de cada parâmetro no tempo correspondente da análise;

a_0 = valor do parâmetro a^* no tempo zero da análise.

Além da obtenção do índice de escurecimento, com os valores de a^* e b^* , foi possível calcular o Croma (C^*), o qual indica a saturação e é proporcional à intensidade de sua cor (3). Também foi calculado o ângulo hue (h°), cujo propósito é determinar a tonalidade da cor da polpa das frutas (4).

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (3)$$

$$h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad (4)$$

2.2.2.3 Determinação da atividade enzimática em maçãs

Para a determinação da atividade enzimática relacionada ao escurecimento enzimático das maçãs, foram realizadas as análises espectrofotométricas, adaptadas em leitor de microplaca (Epoch microplate spectrophotometer, Synergy BIOTEK, Winooski, VT, EUA) para as enzimas Polifenoloxidase (PPO) e Peroxidase (POD).

Primeiramente, foi obtido o extrato enzimático a ser utilizado nas análises futuras. Para tal, o procedimento foi realizado de acordo com a metodologia de Jang e Moon (2011), na qual utilizou-se 25 g do mesocarpo de maçã congelada que foi triturado em processador doméstico (Walita, Philips, Brasil) com 50 mL de tampão fosfato (50 mmol/L pH 5,0) e 2,5 g de polivinilpirrolidona (PVP) durante 2 minutos. Após o decorrer do tempo, a solução foi filtrada em papel filtro e centrifugada (MPW Med. Instruments, modelo MPW-351, 600 W, Varsóvia, Polônia) a 2660 g por 15 minutos. A solução sobrenadante foi utilizada como extrato enzimático para a determinação da atividade enzimática das maçãs.

Para a determinação da atividade da enzima Polifenoloxidase (PPO), utilizou-se o método, com adaptações, de Gawlik-Dziki, Szymanowska e Baraniak (2007). Em tampão fosfato (50mmol/L pH 6,8) foi dissolvido pirocatecol e obtida uma solução 10 mmol/L. Desta

solução, 2,95 mL foi adicionada em tubos de ensaio e, logo em seguida, 50 µL do extrato enzimático previamente obtido. Para a obtenção do “branco” da análise, foram adicionados ao tubo 2,95 mL de tampão fosfato, seguido de 50 µL do extrato enzimático. Após agitação, a mistura teve sua absorbância monitorada, a cada minuto, durante 60 min a 470 nm em microplaca.

Para determinar a atividade enzimática da Peroxidase (POD) o procedimento foi realizado segundo Khan e Robinson (1994) com modificações. Em tampão fosfato de sódio (100 mol/L, pH 5,0) adicionou-se peróxido de hidrogênio, obtendo uma solução final de 0,1%. Desta solução, 1,4 mL foram adicionadas em um tubo de ensaio, seguido de 200 µL do extrato enzimático e 1,4 mL de solução de guaiacol 0,5%, nesta ordem. O “branco” da análise foi obtido com 1,4 mL de tampão fosfato, seguido de 200 µL do extrato enzimático e 1,4 mL de solução 0,5% de guaiacol. Após agitação, a absorbância a 470 nm da mistura foi monitorada a cada minuto por um período de 60 minutos.

De acordo com Valderrama, Maragoni e Clemente (2001) e Kumar et al. (2008), os resultados foram expressos em unidade de atividade enzimática por grama de fruta congelada (U/g).

2.2.2.4 Extração dos compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos das maçãs foi realizada segundo a metodologia de Alberti et al. (2017). As maçãs inteiras foram trituradas em multiprocessador de alimentos e, imediatamente, imersas em nitrogênio líquido (1:2 p/v) e liofilizadas (LD 1500, Terroni, Brasil). Após retirar as sementes, as frutas liofilizadas foram homogeneizadas em almofariz. Para extração dos compostos fenólicos, dois gramas de amostra foram misturados com 30 mL de metanol 85%, e a mistura foi mantida em repouso por 15 minutos a 28°C. Esta primeira etapa da extração foi repetida mais uma vez. Em seguida, para a mesma amostra, foram adicionadas 30 mL de acetona 65%, correspondendo à segunda etapa da extração, por 20 minutos a 10°C, sendo este procedimento, também, realizado duas vezes. Os extratos foram combinados e centrifugados (2660 g por 20 minutos), rotaevaporados a 40°C (Tecnal TE- 211, Brasil) e liofilizados. Estes extratos foram utilizados para as análises da composição fenólica e de fenóis individuais por cromatografia.

2.2.2.5 Determinação da composição fenólica total das maçãs

O método de Folin-Ciocalteu, segundo Singleton e Rossi (1965), foi utilizado com adaptações: em 0,1 mL de amostra, foram adicionados 0,5 mL do reagente Folin- Ciocalteu (0,2 N) e 8,4 mL de água destilada. Após agitar e incubar por 3 minutos, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio (1N), e após agitação a mistura foi incubada, na ausência de luz, por 60 minutos. A leitura da análise foi realizada a 720 nm em espectrofotômetro (SHIMADZU, UV mini-1240, Brasil). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido clorogênico ($CFT = 588,23 \times \text{absorbância}$, $R^2 = 0,998$) por quilograma de maçã (mg EAC/kg).

A análise para obtenção do teor de flavonoides totais foi realizada de acordo com Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999). Com adaptações, a análise foi realizada com a utilização de 250 μ L de amostra, adição de 2 mL de água destilada e posterior agitação (Vortex Mixer KMC – 13000V, Vision Científic, Yuseong-Gu, Daejeon-Si, Coreia). Na sequência, foram adicionados 120 μ L de nitrato de sódio (NaNO_2) (0,5 mol/L) e a mistura foi deixada em repouso por 5 minutos. Após o tempo transcorrido, 120 μ L de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (10%) foram adicionados à mistura e, após 5 minutos de repouso, 800 μ L de hidróxido de sódio (NaOH) (1mol/L) foram adicionados à mistura. A leitura foi realizada a 510 nm em espectrofotômetro (SHIMADZU, UVmini-1240, SP, Brasil) com curva padrão em catequina e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de catequina ($FT = 256,41 \times \text{absorbância}$; $R^2 = 0,999$) por quilograma de fruta (mgECAT/kg).

2.2.2.6 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

✓ Método de DPPH: A análise da captura do radical livre DPPH, foi realizada de acordo com Brand- Williams, Cuvelier e Berset (1995) com adaptações para o leitor de microplaca: em 50 μL de amostra, foram adicionados 250 μL do reagente DPPH (125 mol/L) (previamente diluído em metanol). A placa foi agitada e, após 30 minutos na ausência de luz, a leitura foi realizada a 517 nm. Os resultados foram calculados com o uso de uma curva de calibração previamente preparada com o padrão Trolox ($\text{DPPH} = 22,72 \times \text{absorbância}$, $R^2 = 0,996$).

✓ Método de FRAP: Baseada na metodologia de Benzie e Strain (1996), através da atividade antioxidante de redução do ferro, em 10 μL de amostra, foram adicionados 290 μL do reagente FRAP, previamente preparado. Após agitação da placa e espera de 30 minutos armazenada na ausência de luz, a leitura foi realizada a 593 nm com curva padrão em Trolox ($\text{FRAP} = 1111,11 \times \text{absorbância}$, $R^2 = 0,997$).

✓ Método de ABTS: Através da descoloração do cátion ABTS, a análise foi realizada segundo Re et al. (1999), também com adaptações ao leitor de microplaca. A solução estoque de ABTS, foi preparada com uma antecedência de 16 horas. Em 20 μL de amostra, foram adicionados 280 μL do reagente ABTS e, após 30 minutos na ausência de luz, foi realizada uma leitura a 734 nm. Os resultados foram comparados com uma curva de Trolox previamente preparada ($\text{ABTS} = 4,55 \times \text{absorbância}$, $R^2 = 0,995$).

Em todos os três métodos utilizados para determinação da atividade antioxidante das amostras, os resultados foram expressos micromol de equivalentes de Trolox por quilograma de fruta ($\mu\text{molTE/kg}$).

2.2.2.7 Determinação do teor de ácido ascórbico

O teor de ácido ascórbico foi determinado de acordo com Sánches-Rangel et al. (2013). Com a utilização e adaptação da análise de Folin-Ciocalteu para determinação de compostos fenólicos totais, em leitor de microplaca, foram utilizados 15 μL de amostra, seguido de 240 μL de água destilada e, por fim, 15 μL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos de incubação da amostra, foi realizada a leitura a 765 nm de absorbância em microplaca (Epoch microplate spectrophotometer, Synergy BIOTEC, EUA). As absorbâncias das amostras foram comparadas a uma curva padrão de ácido ascórbico, previamente calculada [$\text{ABS} = 0,0065\text{AA} - 0,0049$; $R^2 = 0,989$], e os resultados expressos em mg/100g em ácido ascórbico.

2.2.2.8 Teste da efetividade do ácido ascórbico em maçãs

Com a utilização da cultivar Gala, obtida no comércio de Ponta Grossa, realizou-se o teste para verificar a influência da concentração de ácido ascórbico no fenômeno do escurecimento enzimático. Após o processamento das frutas (Black Decker, SB60, Brasil), foi adicionado, ao triturado, ácido ascórbico nas concentrações de 0, 30, 60, 90, 120 e 150 mg/100g. Após a prensagem (0,25 kgf/cm²), o suco obtido foi centrifugado (MPW Med. Instruments, MPW-351, Polônia) a 2660 *g* por 10 minutos e, logo em seguida, foi realizada a análise colorimétrica (CM-5-ID, KONICA MINOLTA, Japão) com a obtenção dos parâmetros L*, a* e b*, seguidos dos cálculos de intensidade de cor, Croma, e ângulo da tonalidade, por ângulo *hue*. A análise dos sucos, expostos ao ambiente, foi realizada nos tempos zero, 30 e 60 minutos.

2.2.2.9 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos individuais

A análise dos compostos fenólicos individuais foi realizada de acordo com o método otimizado por Alberti et al. (2014), com identificação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O cromatógrafo (2695 Alliance, Waters, EUA) é equipado com bomba quaternária, injetor automático de amostras e detector de arranjo de diodos PDA 2998 (Waters, EUA). A separação foi realizada em uma coluna Symmetry C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) a 20 °C nas condições: fase móvel ácido acético 2,5%, (v/v; solvente A) e acetonitrila (solvente B), aplicados no gradiente 3 - 9% de B, 9 - 16% de B, 16 - 36,4% de B, seguido de uma eluição isocrática a 100% de B (5 minutos) e recondicionamento da coluna (3% de B) em um fluxo de 1,0 mL/ min. Os compostos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção e espectros obtidos por padrões (Tabela 1). As corridas foram monitoradas a 280 nm para flavan-3-óis e dihidrochalconas, 320 nm para ácidos hidroxicinâmicos e 350 nm para flavonóis.

Tabela 1. Parâmetros cromatográficos dos padrões utilizados

Composto fenólico	TR (min)	Banda UV (nm)	Regressão linear	R ²	LOD (ug/mL)	LOQ (ug/mL)
Ácido gálico	3,11	271,5	y=24519x-29541	0,998	0,78	2,35

Ácido clorogênico	9,212	326,2	$y=25239x-13321$	0,997	0,59	1,80
Ácido p-cumárico	15,522	310,7	$y=61187x-85345$	0,998	0,52	1,59
Ácido Cafeico	10,923	323,8	$y=39960x+80223$	0,984	0,07	0,20
(+)-catequina	8,713	279,8	$y=5999x-9084$	0,999	0,99	3,00
(-)-epicatequina	12,186	279,8	$y=5729x+13748$	0,992	3,34	10,13
Procianidina B2	10,17	279,8	$y=5684,6x+6661$	0,998	0,52	1,58
Floridzina	24,502	285,8	$y=17194x-30986$	0,997	1,28	3,86
Floretina	32,356	285,8	$y=34406x-12344$	0,999	0,33	0,99
Quercetina	23,482	376,2	$y=19302x-20826$	0,998	0,18	0,53
Quercetina-3-O- rutinosídeo	18,734	354,9	$y=14303x-72994$	0,998	0,50	1,52
Quercetina-3-D-galactosídeo	18,992	354,9	$y=14225x-2367,6$	0,999	0,29	0,89
Quercetina-3-β-D-glucosídeo	19,55	354,9	$y=22090x-59247$	0,998	0,03	0,08
Quercetina-3-O-arabinofuranosídeo	21,16	353,7	$y=19875x-29203$	0,998	0,29	0,89
Quercetina-3-O-raminosídeo	21,959	348,9	$y=20504x-34187$	0,989	0,15	0,46

Nota: TR: tempo de retenção; y= absorbância (nm) e x= concentração (mg/L); LOQ: limite de quantificação; LOD: limite de detecção.

2.2.2.10 Análises Estatísticas

Todas as análises foram realizadas no mínimo em triplicatas com cálculo de média e desvio padrão. O teste de Levene foi utilizado para avaliar a homogeneidade de variâncias das amostras. Nas amostras homogêneas, foi aplicado o teste de ANOVA fator único, seguido do Fisher LSD para verificar diferenças significativas entre as amostras. O teste de correlação de Pearson (r), foi utilizado para determinar a intensidade de correlação entre os resultados obtidos. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA 7.0 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização das frutas *in natura*

O cruzamento entre as cultivares Imperatriz e Primícia, com o melhoramento genético, permite a obtenção de cultivares híbridas com maior potencial adaptativo das plantas, resistência às pragas e doenças, com o intuito de produzir frutas de alta qualidade, com maior potencial de armazenagem e até com aspectos nutricionais diferenciados (FURLAN et al., 2010; ERCOLI et al., 2017). A Tabela 2 apresenta as características físicas das frutas híbridas e das cultivares comerciais estudadas.

Tabela 2. Parâmetros físicos das maçãs comerciais e híbridas

Cultivares	Diâmetro (mm)	Altura (mm)	Massa (g)	Umidade (%)	Índice de maturação
Gala	74 ^{bcd} ± 3	67,9 ^{ab} ± 2,6	183 ^e ± 3	88,3 ^{ab} ± 0,2	6
Fuji	75 ^{bc} ± 2	66 ^{abc} ± 2	191 ^d ± 2	86,3 ^f ± 0,3	6
Red Delicious	71 ^{cde} ± 5	71 ^{ab} ± 5	193 ^d ± 3	88,3 ^a ± 0,3	6
Granny Smith	81 ^b ± 2	73 ^a ± 2	224 ^b ± 3	87,9 ^{bc} ± 0,3	7
Monalisa	67 ^{def} ± 2	63 ^{bc} ± 3	135,8 ^k ± 0,7	83,2 ⁱ ± 0,2	7
Elenise	76 ^{bc} ± 5	70 ^{ab} ± 5	196 ^c ± 1	83,56 ⁱ ± 0,04	6
Maxi Gala	66 ^{def} ± 3	70 ^{ab} ± 7	159,4 ⁱ ± 0,5	83,4 ⁱ ± 0,1	6
170/23	77 ^{bc} ± 4	62 ^{bc} ± 4	194 ^{cd} ± 1	88,6 ^a ± 0,2	7
170/25	73 ^{bcd} ± 6	65 ^{abc} ± 6	168 ^h ± 1	87,7 ^c ± 0,1	7
170/30	71 ^{cde} ± 5	62 ^{bcd} ± 5	174 ^g ± 1	85,5 ^g ± 0,2	7
170/32	64 ^{efg} ± 9	52 ^{cde} ± 7	150 ^j ± 5	85,4 ^g ± 0,3	6
170/40	90 ^a ± 4	72 ^a ± 4	295 ^a ± 9	87,0 ^e ± 0,4	6
170/91	57 ^g ± 7	57 ^{cde} ± 8	124 ^l ± 1	85,5 ^g ± 0,2	6
170/114	58 ^g ± 6	50 ^e ± 8	94,3 ⁿ ± 0,6	87,45 ^{cd} ± 0,03	6
170/116	73 ^{cd} ± 9	58 ^{cde} ± 8	178,5 ^f ± 0,5	84,74 ^h ± 0,02	7
170/118	60 ^{fg} ± 2	53 ^{de} ± 2	96,5 ^m ± 0,6	87,11 ^{cd} ± 0,04	7

Nota: Resultados expressos com média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo pelo teste de Fisher LSD.

O tamanho dos frutos está relacionado com a divisão e expansão celular durante sua formação que depende da cultivar, estação do ano, clima, condições do solo e local geográfico, sendo estes parâmetros também influentes na umidade do fruto (LOONEY, 1996; JANZANTTI; FRANCO; WOSIACKI, 2003; RIZZON; BERNARDI; MIELLE, 2005). De acordo com Gongal, Karkee e Amatya (2018), os quais obtiveram as dimensões para a cultivar comercial Fuji, a média do diâmetro, para um número representativo das frutas, foi de 67,8 mm, o que é similar ao obtido em relação às cultivares comerciais e à maioria das seleções híbridas

utilizadas neste trabalho. Para Wójcik, Filipczak e Wójcik (2019), a média das massas das maçãs em estudo foi 180 g, semelhante à média das 16 maçãs estudadas com, aproximadamente, 172g. O índice de maturação, de acordo com o padrão apresentado por Blanpied e Silsby (1992), encontra-se, para todas as maçãs, entre 3-4, o que representa uma maturação plena para todas as análises deste estudo.

A partir dos resultados, observa-se que as maçãs híbridas, em sua maioria, possuem suas dimensões físicas semelhantes às maçãs de mesa, sendo uma das características favoráveis para a sua comercialização futura. A híbrida 170/40, em particular, possui a média das dimensões de altura e diâmetro, assim como sua massa, superiores às demais. Quanto à umidade das frutas, atenta-se para a 170/23 a qual possui, estatisticamente, a maior umidade entre as seleções híbridas (88,6%). Esta maçã, inclusive, apresentou umidade superior às cultivares comerciais Maxi Gala, Elenise e Monalisa, com os menores teores do conjunto (83,4; 83,56 e 83,2%, respectivamente), o que pressupõe ser uma característica positiva para a suculência do fruto e, futuramente, difundi-la às novas cultivares e, se somado às demais características, substituí-las no mercado e no processamento. Vale salientar que as quatro cultivares obtidas no comércio de Ponta Grossa (Gala, Fuji, Red Delicious e Granny Smith) passaram pela etapa de classificação antes de serem expostas ao consumidor, com características físicas ideais para a comercialização *in natura*, sem variações de tamanho ou massa. A massa média destas foi de, aproximadamente, 190g. Como as seleções híbridas ainda não são cultivares comerciais, não se dispunham de muitas plantas e, conseqüentemente, de grande volume de frutas. Assim, as frutas não foram previamente classificadas. Em relação ao tamanho dos frutos, observa-se que todas as seleções híbridas do programa de melhoramento genético de macieira da EPAGRI possuem tamanho similar ou mais elevado em comparação às maçãs das cultivares tradicionais, o que pode representar um aspecto favorável até mesmo no mercado de frutas *in natura*.

2.3.2 Determinação do escurecimento e atividade enzimática na polpa de maçãs

Os resultados dos parâmetros de cor na fruta inteira, segundos após o corte e ao final de 60 minutos de análise, com diferença estatística, constam na Tabela 3:

Tabela 3. Parâmetros de cor da polpa de maçãs *in natura* no tempo zero e após 60 minutos do corte

Tempo zero após o corte						60 minutos após o corte				
Cultivares	L*	a*	b*	Croma	Hue (°)	L*	a*	b*	Croma	Hue (°)
Gala	61,6 ^{bA} ± 0,1	1,76 ^{cB} ± 0,1	29 ^{bB} ± 2	29,6 ^{aB} ± 0,1	86,5 ^{aA} ± 0,1	55,3 ^{cdB} ± 0,8	7,6 ^{fgA} ± 0,1	40 ^{bcA} ± 2	36 ^{bA} ± 2	77,7 ^{bB} ± 0,4
Fuji	51,9 ^{cA} ± 0,2	2 ^{cB} ± 3	19 ^{cB} ± 1	19,2 ^{cB} ± 0,2	83,5 ^{aA} ± 0,2	53 ^{cdeB} ± 2	7,2 ^{gA} ± 0,6	24,8 ^{gA} ± 0,1	25,9 ^{fA} ± 0,2	74 ^{cdeB} ± 1
Red Delicious	74,7 ^{aA} ± 0,1	0,4 ^{eB} ± 0,2	28,2 ^{aB} ± 0,1	27,7 ^{abB} ± 0,1	89,5 ^{aA} ± 0,1	52 ^{cdefB} ± 6	10,5 ^{bcA} ± 0,5	41,6 ^{aA} ± 0,1	42,9 ^{aA} ± 0,1	75,8 ^{bcB} ± 0,6
Granny Smith	49,6 ^{cA} ± 0,2	2 ^{cB} ± 1	24,1 ^{bB} ± 0,2	24,3 ^{bB} ± 0,2	85,4 ^{aA} ± 0,3	55,6 ^{cdA} ± 0,2	10,3 ^{cdA} ± 0,1	30,4 ^{defA} ± 0,9	32,1 ^{cdA} ± 0,1	71,2 ^{efB} ± 0,2
Monalisa	50,4 ^{cA} ± 0,3	3,3 ^{bB} ± 0,1	19,2 ^{cB} ± 0,4	19,5 ^{cB} ± 0,1	75 ^{bcA} ± 1	38,5 ^{iB} ± 0,3	13,8 ^{aA} ± 0,2	32,9 ^{bcdA} ± 0,1	35,7 ^{bA} ± 0,1	68,9 ^{gB} ± 0,1
Elenise	46,7 ^{cA} ± 0,1	3,1 ^{bB} ± 0,2	18,5 ^{cB} ± 0,1	19,4 ^{cB} ± 0,3	80,3 ^{bA} ± 0,1	44,1 ^{ghiA} ± 0,2	8 ^{fA} ± 1	24 ^{gA} ± 1	25 ^{fA} ± 4	70,0 ^{gB} ± 0,3
Maxi Gala	59,6 ^{bA} ± 0,1	1,8 ^{cB} ± 0,1	19,6 ^{cB} ± 0,1	25,1 ^{bB} ± 0,1	87,3 ^{aA} ± 0,1	29,2 ^{jB} ± 0,4	11,1 ^{bA} ± 0,1	43 ^{aA} ± 1	45 ^{aA} ± 1	75,6 ^{bcB} ± 0,4
170/23	51,2 ^{cA} ± 0,2	2,8 ^{bB} ± 0,1	19,1 ^{cB} ± 0,2	22 ^{cA} ± 1	61 ^{dB} ± 1	56,2 ^{cdA} ± 0,2	5,9 ^{hA} ± 0,9	24,5 ^{gA} ± 0,9	25 ^{fA} ± 5	76 ^{bcA} ± 5
170/25	70 ^{aA} ± 0,3	1,8 ^{dA} ± 0,2	13,2 ^{dB} ± 0,1	18,6 ^{dA} ± 0,1	60,3 ^{dB} ± 0,1	68,0 ^{aA} ± 0,1	2,7 ^{iA} ± 0,1	18,1 ^{hA} ± 0,4	20 ^{gA} ± 3	67 ^{gA} ± 4
170/30	52,3 ^{cA} ± 0,1	3,5 ^{bB} ± 0,1	17,1 ^{cdB} ± 0,3	19,7 ^{cB} ± 0,3	73,2 ^{cA} ± 0,2	40 ^{hiB} ± 1	7,5 ^{gA} ± 0,7	28,5 ^{gA} ± 0,1	23,7 ^{fA} ± 0,2	72 ^{defA} ± 2
170/32	65 ^{abA} ± 0,4	1,3 ^{dB} ± 0,2	20,5 ^{cB} ± 0,1	20,7 ^{cB} ± 0,1	77 ^{bB} ± 1	46 ^{fghB} ± 3	2,9 ^{iA} ± 0,1	29,8 ^{efA} ± 0,5	30,1 ^{deA} ± 0,5	84,4 ^{aA} ± 0,4
170/40	63,8 ^{aA} ± 0,2	2 ^{cB} ± 3	19,1 ^{cB} ± 0,1	19,3 ^{cB} ± 0,2	78,1 ^{bB} ± 0,1	47,1 ^{efgB} ± 0,8	5,1 ^{hA} ± 0,8	28,5 ^{fA} ± 0,8	28,7 ^{eA} ± 0,7	84,5 ^{aA} ± 2
170/91	64,1 ^{bA} ± 0,3	4,6 ^{aB} ± 0,1	25,1 ^{bB} ± 0,1	25,9 ^{bB} ± 0,3	68,2 ^{cdB} ± 0,2	51 ^{defB} ± 1	8,9 ^{eA} ± 0,3	32,3 ^{cdeA} ± 0,3	34 ^{bcA} ± 3	74 ^{cA} ± 2
170/114	63,9 ^{bA} ± 0,5	3,9 ^{abB} ± 0,4	18 ^{cB} ± 1	19,8 ^{cB} ± 0,2	71,2 ^{cB} ± 0,3	52 ^{defB} ± 3	6,2 ^{hA} ± 0,2	29 ^{fA} ± 2	30 ^{deA} ± 3	77,6 ^{bA} ± 0,2
170/116	65,3 ^{abA} ± 0,1	2,6 ^c ± 0,1	18,2 ^{cB} ± 0,2	20,7 ^{cB} ± 0,1	77,5 ^{bB} ± 0,1	58 ^{bcB} ± 2	7,4 ^g ± 0,6	35,3 ^{bA} ± 0,7	35,7 ^{bA} ± 0,6	82 ^{aA} ± 1
170/118	72 ^{aA} ± 1	4,5 ^{aB} ± 0,1	27,2 ^{bB} ± 0,3	29,5 ^{aB} ± 0,5	73 ^{cB} ± 1	63,3 ^{abB} ± 0,1	9,8 ^{dA} ± 0,7	34,7 ^{bcA} ± 0,3	36,1 ^{bA} ± 0,5	74,2 ^{dA} ± 0,1

Nota: Resultados expressos com média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) de acordo com o teste de Fisher LSD.

Dentre os principais parâmetros para a determinação da cor em matrizes alimentares destacam-se o Croma, com a representação da saturação da cor, e o ângulo *hue*, a tonalidade da cor com o decorrer do escurecimento da matriz. Um valor de 0° ou 360° indica a tonalidade vermelha, enquanto 90°, 180° e 270° indicam, respectivamente, a tonalidade amarela, verde e azul (BARREIRO et al. 1997; MASKAN, 2000).

Na Tabela 3, podem-se observar os fatores utilizados para a obtenção dos cálculos do Croma e ângulo *hue* nas polpas de maçã *in natura*. Estes parâmetros foram obtidos com segundos após o corte longitudinal das frutas e, após o intervalo de tempo de 60 minutos em exposição ao ambiente. A luminosidade, representada por L* e com valores entre 0 e 100, permite observar a claridade da polpa. Quanto maiores os valores de L*, mais translúcida se encontra a amostra e, assim, menor o escurecimento da mesma. Quanto à tonalidade de cor, o valor de a* indica a variação do verde ao vermelho, enquanto o parâmetro b*, a tonalidade do azul ao amarelo.

Após o intervalo de 60 minutos, de acordo com os parâmetros de cor obtidos entre as 16 cultivares, os valores de L* para as frutas comerciais, oscilaram de 29,2 a 55,6. Para o parâmetro a*, de 7,2 a 13,8 e b*, 24 a 43. Quanto ao Croma, a faixa de resultados foi de 25 a 45 e, para o ângulo *hue*, de 68,9 a 77,7°. Segundo Moura et al. (2007), os quais determinaram a vida de prateleira de maçãs e seus produtos, a cultivar em estudo Fuji, apresentou valores médios de 44,8 para L*, 25,6 para a* e 24,5 para b* com frutas submetidas às análises logo após o momento do corte longitudinal. Cárdenas-Pérez et al. (2017), em análises da polpa da cultivar Golden Delicious, obtiveram valores de Croma variando entre 62,0 a 72,0 e, para o ângulo *hue*, 73,0 a 97,0°.

Para as seleções da série 170, após 60 minutos, os valores de L* variaram de 40 a 68, o parâmetro a* de 2,7-9,8, e para b* 18,1-35,3. O valor da intensidade de cor, Chroma, oscilou entre 19,6 a 36,1 e o ângulo *hue* possuiu variação de resultados de 67,0 a 82,0. Em comparação com o tempo zero de análise, destacam-se as híbridas 170/23 e 170/25, com os menores valores do conjunto. Em relação à luminosidade da polpa, houve uma redução de apenas 10% para as duas seleções em destaque. Quanto à intensidade de cor, estimado pelo valor de Croma, houve um aumento de apenas 7% para a 170/25 e 13% para a 170/23.

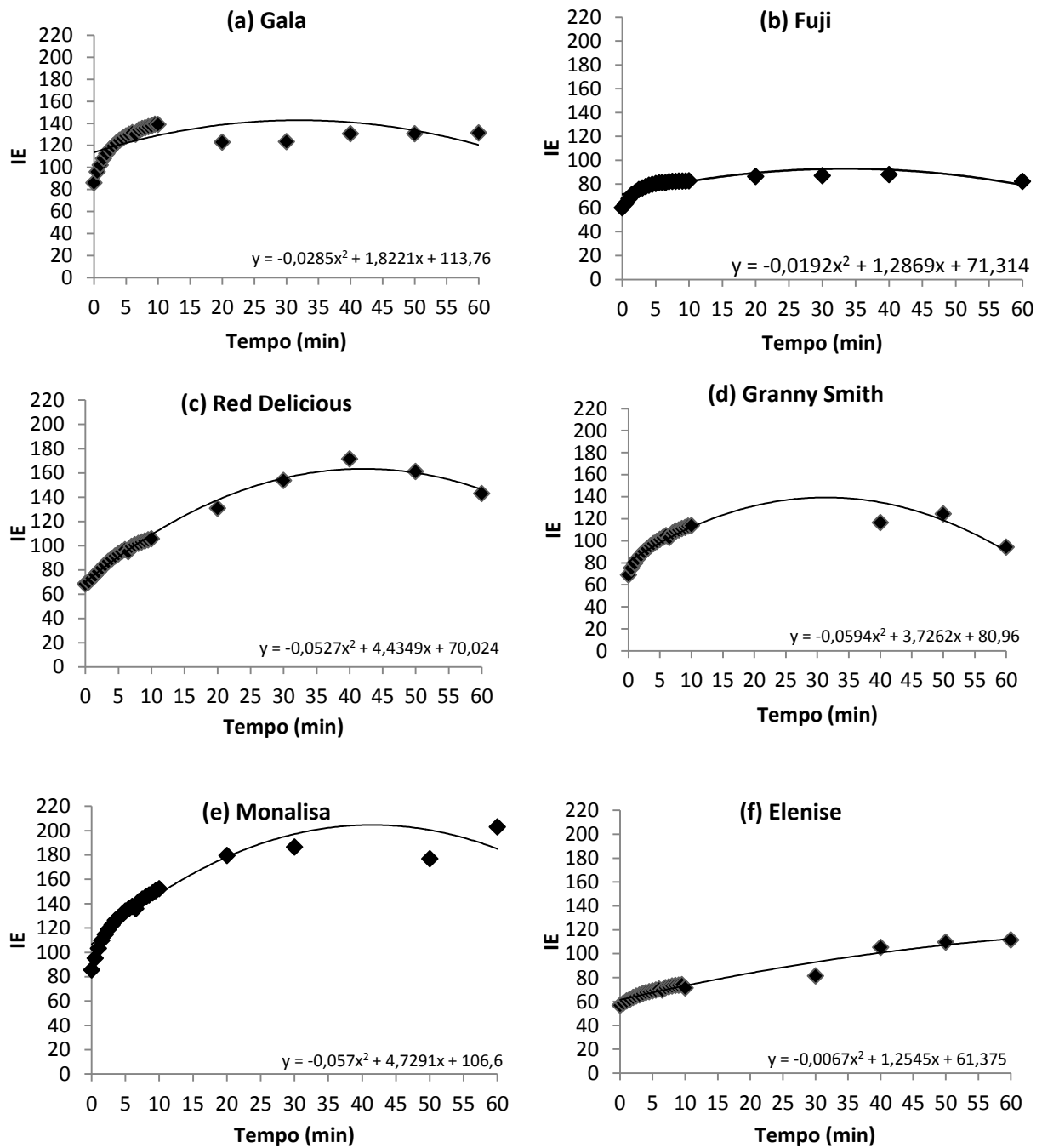
As maçãs comerciais Maxi Gala, Monalisa e Red Delicious, no entanto, dentre as demais frutas analisadas, apresentaram um escurecimento mais expressivo após 60 minutos, quando expostas ao ambiente. Isto é evidenciado pelo aumento significativo na intensidade de cor e parâmetros a* e b*, além da diminuição da luminosidade. Em relação ao tempo zero da análise, estas cultivares obtiveram um aumento da intensidade de cor de 56%, 55,7% e 52%,

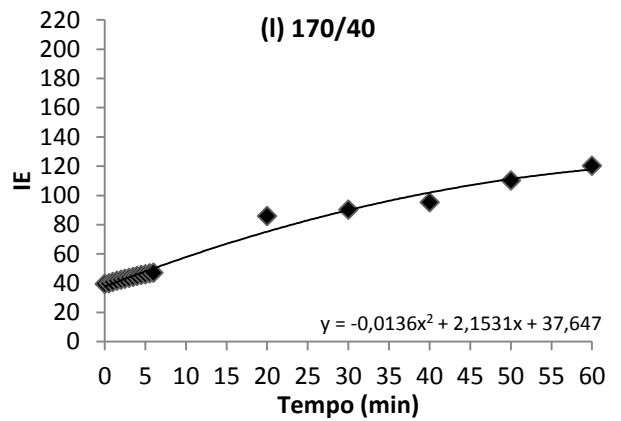
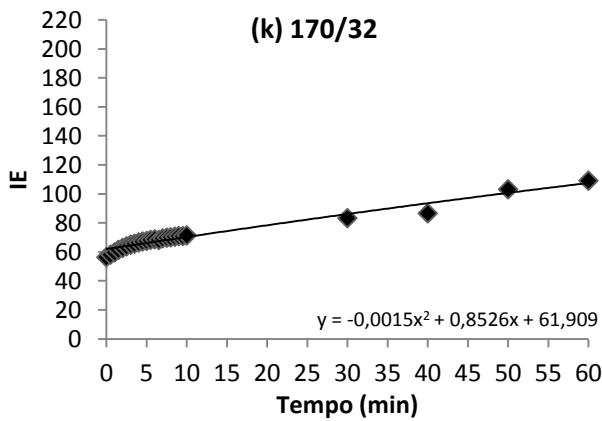
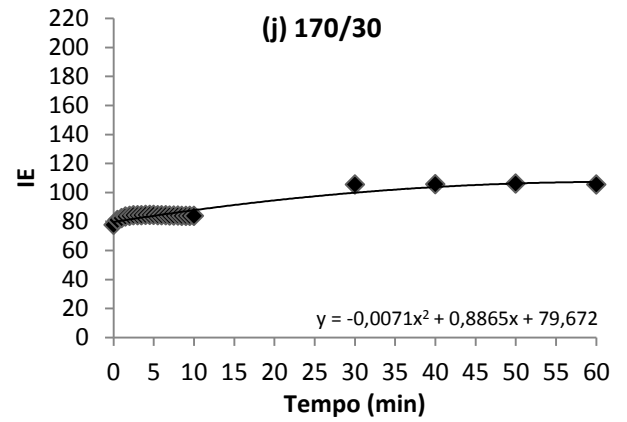
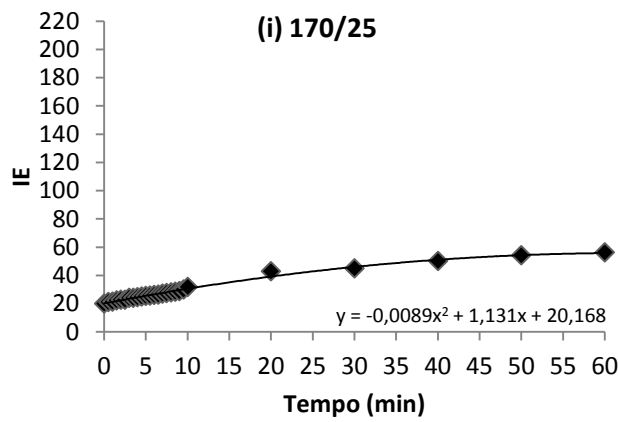
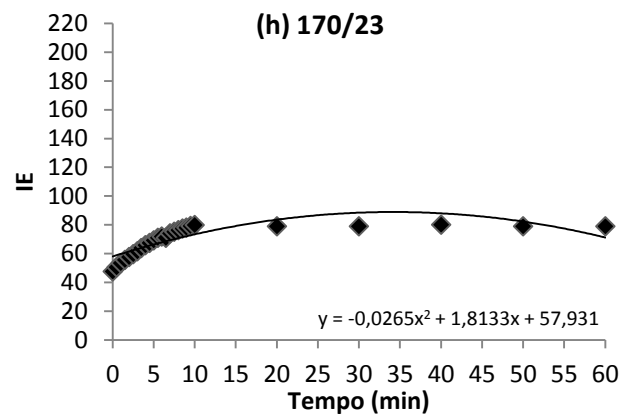
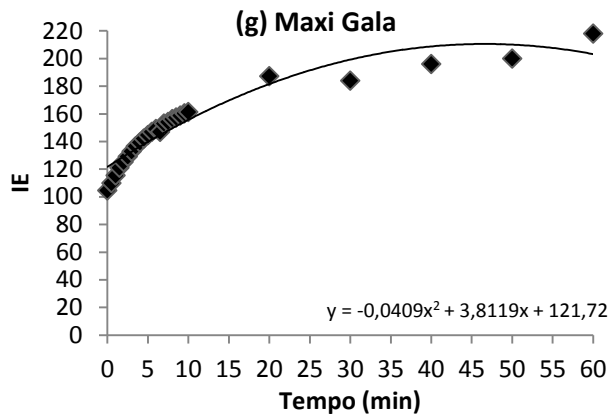
respectivamente. Ademais, a luminosidade para as maçãs destas três cultivares de mesa reduziu em 50%, 76% e 70%, nesta ordem. De acordo com Lee et al. (2003), um decréscimo no valor de L^* , associado com o aumento do parâmetro croma, é uma alternativa de medição do grau de escurecimento que se desenvolve em frutas frescas.

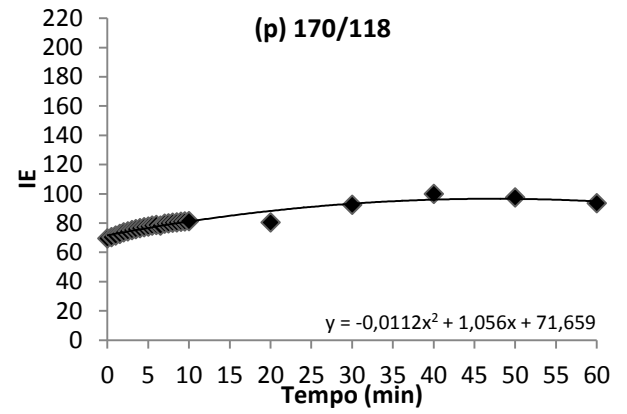
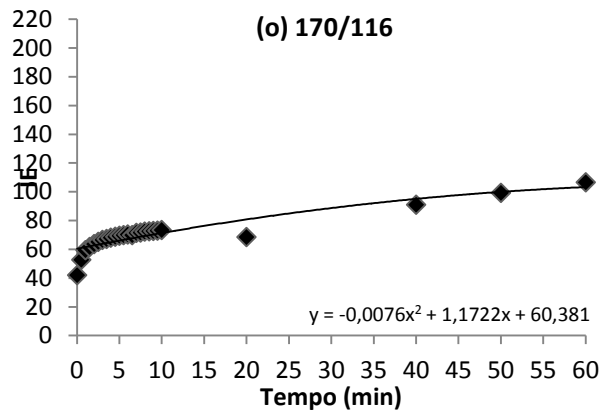
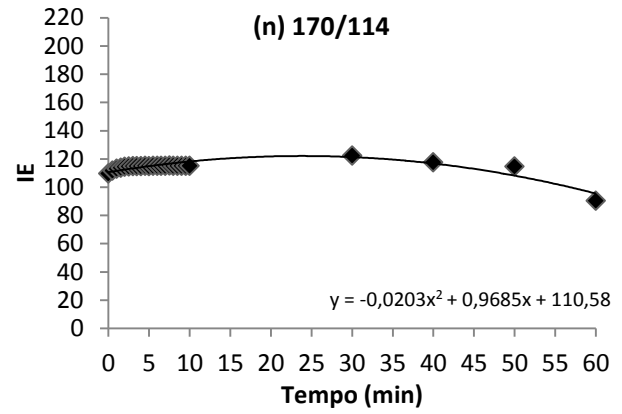
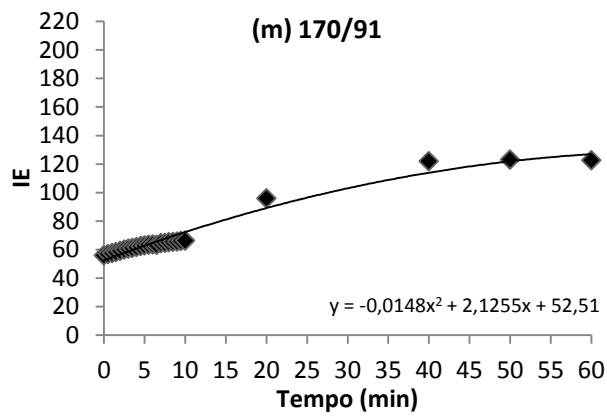
Após o intervalo de 60 minutos, comparando a maçã 170/25 com as maçãs comerciais de escurecimento mais intenso, observa-se uma diferença de, aproximadamente, 56% a mais na luminosidade da polpa da híbrida, além da redução em 44,5% da intensidade da cor, medida por Croma. Quanto às demais frutas da série 170, os parâmetros de cor, estatisticamente, são semelhantes às maçãs de mesa, indicando um escurecimento similar da polpa das mesmas após o tempo de análise decorrido.

Além das propriedades de coloração da Tabela 3, outros parâmetros devem ser analisados e discutidos em relação ao escurecimento enzimático das maçãs híbridas e comerciais. Estes parâmetros são estimados na Tabela 4, na qual constam os valores do índice de escurecimento das polpas, obtidos por métodos colorimétricos, em paralelo com a atividade enzimática das principais enzimas atuantes neste fenômeno. O índice de escurecimento representa a variação da coloração resultante da oxidação enzimática. É um importante parâmetro tecnológico para monitorar o escurecimento de diferentes frutos e vegetais, uma vez que a determinação da cor superficial é mais simples e rápida do que análises químicas. Também com a utilização em conjunto dos parâmetros de cor obtidos no colorímetro (L^* , a^* e b^*), é possível calcular o índice de escurecimento (MASKAN, 2000; BAL; KAR; SANTOSH, 2011; CEFOLA *et al.* 2012). Devido ao índice de escurecimento se diferir com o tempo de exposição da polpa das frutas ao oxigênio, foi possível plotar gráficos, para cada cultivar, relacionando o índice de escurecimento com o período de análise de 60 minutos (Figura 15). Na Tabela 4, então, observa-se que a variação deste parâmetro foi de 56 para a seleção 170/25 a 218,24, para Maxi Gala.

Figura 15. Índice de escurecimento (IE) da polpa de maçãs comerciais e híbridas ao longo do período de 60 minutos.







Nota: $R^2 = 0,933$ (a); $0,877$ (b); $0,993$ (c); $0,993$ (d); $0,903$ (e); $0,953$ (f); $0,909$ (g); $0,899$ (h); $0,991$ (i); $0,922$ (j); $0,958$ (k); $0,984$ (l). $0,969$ (m); $0,973$ (n); $0,923$ (o); $0,933$ (p).

Tabela 4. Índice de escurecimento e atividade enzimática em maçãs comerciais e híbridas

Cultivares	Índice de escurecimento	PPO (U/g)	POD (U/g)
Gala	114 ^{cde} ± 16	2 ^b ± 0,6	39,1 ^c ± 0,4
Fuji	78 ^h ± 2	1 ^{ef} ± 0,1	60 ^b ± 1
Red Delicious	164 ^b ± 35	1 ^{ef} ± 0,5	42 ^a ± 3
Granny Smith	100,36 ^{efg} ± 0,06	2 ^b ± 0,1	19,66 ^e ± 0,01
Monalisa	217 ^a ± 20	1 ^{ef} ± 0,4	14 ^f ± 1
Elenise	98 ^{efg} ± 10	2,8 ^a ± 0,2	5,33 ⁱ ± 0,01
Maxi Gala	218 ^a ± 14	1,9 ^b ± 0,3	23 ^d ± 1
170/23	79 ^h ± 33	0,6 ^g ± 0,7	0,7 ^j ± 0,1
170/25	56 ⁱ ± 1	0,3 ^h ± 0,1	0,67 ^j ± 0,01
170/30	103 ^{defg} ± 1	1 ^{ef} ± 0,9	8,0 ⁱ ± 0,1
170/32	109,2 ^{cdef} ± 0,7	1 ^{ef} ± 0,3	10 ^g ± 1
170/40	120 ^{cd} ± 14	1,5 ^{cd} ± 0,8	5,42 ⁱ ± 0,05
170/91	122 ^c ± 11	1 ^{ef} ± 0,3	16,3 ^f ± 0,5
170/114	90 ^{gh} ± 5	1,6 ^c ± 0,6	20,0 ^e ± 0,7
170/116	106 ^{cdefg} ± 14	0,9 ^{ef} ± 0,2	6,48 ^{h,i} ± 0,05
170/118	93 ^{fgh} ± 4	0,9 ^{ef} ± 0,5	0,98 ^j ± 0,06

Nota: Resultados expressos com média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Fisher LSD.

Em trabalhos realizados com o aumento da vida de prateleira de maçãs da cultivar Red Delicious, Zambrano-Zaragoza et al. (2013), obtiveram valores médios para o índice de escurecimento de, aproximadamente, 80 para maçãs recém cortadas longitudinalmente. Atentando-se novamente para a seleção 170/25, após o corte e exposição da polpa ao ambiente, obteve o menor índice de escurecimento (média de 56) em relação a todas as frutas analisadas mesmo após 1 hora de análise. Em paralelo, a mesma cultivar híbrida apresentou os menores valores de atividade enzimática das enzimas PPO e POD.

As atividades enzimáticas e a intensidade do escurecimento, consequentemente é fortemente dependente da cultivar e do estágio de maturação do fruto (JANOVITZ-KLAPP; RICHARD; NICOLAS, 1989). Estas enzimas estão presentes em todas as fases de desenvolvimento do fruto, no entanto, sua atividade é elevada em frutos jovens ou quando os mesmos sofrem algum estresse mecânico, expondo as enzimas ao substrato e ao oxigênio (YORUK; MARSHALL, 2003). Devido a este fato, estabeleceu-se um padrão de maturação das frutas deste trabalho para a realização de todas as análises.

O escurecimento enzimático em maçãs comerciais é evidenciado, em média, durante os primeiros 10 a 15 minutos de análise (Figura 15), na qual a polpa em contato com o oxigênio do ambiente, escurece à medida que os compostos fenólicos se ligam à estrutura química da PPO e POD (MATEOS et al., 1993; ROCHA; MORAIS, 2001; LE DEUN et al., 2015). O índice de escurecimento enzimático, obtido a cada 0,5 minuto de análise durante o período crítico, é progressivo até um ponto máximo, correspondendo à atividade máxima da PPO e POD sob seus substratos, indicando que a maioria dos mesmos, contidos na superfície em contato com o ar, foram hidrolisados, transformando-se em melanoidinas. Após o ponto máximo de atividade, o índice de escurecimento enzimático ao longo do tempo não se modifica significativamente, tendendo à uma constante durante o tempo final da análise. No entanto, ao cortar longitudinalmente as maçãs e expô-las ao ambiente climatizado, podem ocorrer modificações na região da fruta submetida ao corte, como a perda da umidade, alterando os resultados nas medições sucessivas.

Nos primeiros 15 minutos de análise destacam-se, com um escurecimento expressivo da superfície da polpa, a cultivar Maxi Gala e Monalisa, aproximando-se do índice de escurecimento máximo já no início da exposição ao oxigênio. No entanto, as cultivares comerciais Fuji, Granny Smith e Elenise, apresentaram um escurecimento menos expressivo desde o início do tempo de análise, indicando, dentre o grupo das maçãs comerciais, as de menor escurecimento ao longo de 60 minutos. Para as seleções híbridas, todas apresentaram um escurecimento enzimático tardio, quando comparada as duas de destaque a este fenômeno: Maxi Gala e Monalisa. Em média, o ponto máximo de escurecimento enzimático é observado entre 40-50 minutos em exposição ao oxigênio, uma diferença de, aproximadamente, 40 minutos em relação à Maxi Gala e Monalisa. Dentre as seleções híbridas, destacam-se a 170/23 e 170/25 com os menores índices de escurecimento desde o momento do corte até 60 minutos em exposição ao oxigênio, com indicação de mudanças visuais pouco perceptíveis e pequena concentração de melanoidinas como produto final da reação enzimática.

Dentre os resultados da Tabela 4, a média da atividade enzimática da PPO, entre as sete cultivares comerciais (Gala, Fuji, Maxi Gala, Elenise, Monalisa, Granny Smith e Red Delicious), foi de 1,76 U/g. Já a seleção 170/25, apresentou uma atividade de 0,3U/g, que corresponde a apenas 19% da atividade enzimática das cultivares comerciais. Em sequência, a seleção 170/23, também apresentou uma das menores atividades (0,6 U/g para PPO), que corresponde a somente 33% da atividade enzimática média localizadas nas maçãs comerciais. Para a enzima POD, a média das cultivares comerciais foi de 29,25 U/g, sendo que a seleção 170/25 (0,67 U/g), apresentou somente 2,3% da atividade enzimática em comparação a estas.

Para a seleção 170/23, com 0,7 U/g, representou não mais que 2,6% da atividade enzimática média da POD nas cultivares comerciais. A atividade semelhante da enzima polifenoloxidase entre as demais seleções híbridas da série 170 e as cultivares comerciais, justifica o escurecimento da polpa destas frutas ser, também similar, como indicado pelo índice de escurecimento.

De acordo com os resultados obtidos entre as frutas analisadas, pode-se observar que a atividade enzimática da POD, no geral, é superior à PPO. Por mais que atividade da PPO seja menor, o processo oxidativo dos compostos fenólicos ocorre, principalmente, devido à interação direta desta enzima com o substrato fenólico (JIMENEZ; GARCÍA-CARMONA, 1996). A enzima peroxidase participa da oxidação fenólica por intermédio de peróxidos, como o peróxido de hidrogênio, com a função de ser doador de prótons durante o processo denominado peroxidação. Devido a isso, um pequeno intervalo de tempo é necessário para a reação ocorrer, o que difere da PPO que oxida os substratos fenólicos imediatamente. (FERNÁNDEZ-TRUJILLO et al., 2003). No entanto, a POD tem um aumento da sua solubilidade e atividade durante o período de maturação do fruto, elevando a concentração desta enzima no período pós-climatérico, o que também explica a maior atividade enzimática em comparação à PPO (VALDERRAMA et al., 2001).

Tabela 5. Teor de ácido ascórbico em maçãs híbridas e comerciais.

Cultivares	Ácido Ascórbico (mg/100g)
Gala	2,4 ^g ± 0,5
Fuji	7,9 ^d ± 0,2
Red Delicious	3,6 ^g ± 0,1
Granny Smith	13,2 ^c ± 0,6
Monalisa	4,7 ^{fg} ± 0,2
Elenise	7,0 ^{de} ± 0,7
Maxi Gala	2,3 ^h ± 0,4
170/23	16,6 ^b ± 0,7
170/25	29,2 ^a ± 0,4
170/30	4,8 ^f ± 0,8
170/32	5,5 ^f ± 0,5
170/40	7,4 ^d ± 0,3
170/91	16,2 ^b ± 0,3
170/114	5,9 ^{ef} ± 0,5
170/116	8,0 ^d ± 0,1
170/118	5,0 ^f ± 0,2

Nota: Resultados expressos com média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Fisher LSD.

O teor de ácido ascórbico entre as maçãs variou de 2,3 - 29,2 mg/100g (Tabela 5). Nas maçãs de seleção 170/25, foi observado o maior teor de ácido ascórbico (29,2 mg/100g) dentre todas as maçãs analisadas, seguida pela 170/23 (16,6 mg/100g) e 170/91 (16,2 mg/100g). Laranjas, as quais compõem as frutas cítricas mais consumidas no cotidiano e são fontes conhecidas de ácido ascórbico, são caracterizadas com teores entre 21,4 - 84 mg/100g. (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010; UNICAMP, 2011). Segundo Varmig et al. (2013), estudando maçãs dinamarquesas, observaram variação no teor de ácido ascórbico entre as cultivares de 1-27 mg/100 g. Fang et al. (2017), reportaram variações semelhantes de 1,04 -28 mg/100g de ácido ascórbico em maçãs comerciais e em seleções melhoradas. De acordo com Ertekin Filiz e Seydim (2018), o teor obtido para a cultivar comercial Granny Smith foi de 16,38 mg/100g.

A presença de inibidores, em especial os redutores atuantes no complexo enzima/substrato, possuem grande eficácia no controle do escurecimento enzimático em vegetais (OSUGA et al., 1994). Um dos aditivos atuantes em retardar a oxidação dos compostos fenólicos em frutas e hortaliças é o ácido ascórbico (WILEY, 1994; RAMALHO; JORGE, 2006). Nos vegetais, a presença deste ácido é fundamental para a autodefesa no interior celular, pois possui elevada capacidade antioxidante e participa da captura das espécies reativas ao oxigênio (ROS), como peróxidos e hidroperóxidos, impedindo a toxicidade da célula (LI;

SCHELLHORN, 2007). O escurecimento enzimático é evitado, na presença do ácido ascórbico, devido à sua capacidade antioxidante. Ao invés do oxigênio participar na oxidação dos fenóis, na presença de PPO e POD, atua na oxidação do ácido ascórbico (LI; SCHELLHORN, 2007; FANG et al., 2017).

A atividade enzimática das seleções híbridas 170/25 e 170/23 é baixa em relação às cultivares estudadas. Ademais, o teor de ácido ascórbico é elevado principalmente nestas duas cultivares. O oposto ocorre nas maçãs comerciais, de escurecimento expressivo (Maxi Gala, Gala Red Delicious e Monalisa), as quais apresentaram os menores teores de ácido ascórbico: 2,3; 2,4; 3,6 e 4,7 mg/100g, respectivamente.

A fim de verificar a efetividade do ácido ascórbico como antioxidante, em determinadas concentrações, foi realizado um teste com frutas da cultivar de mesa Gala, obtida no comércio de Ponta Grossa/PR, cuja polpa apresentou um dos maiores índices de escurecimento enzimático.

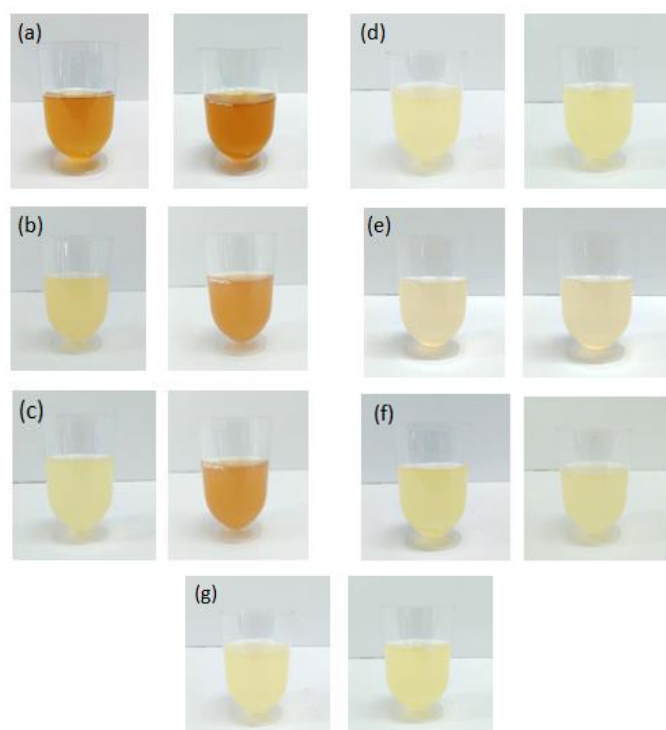
Tabela 6. Efetividade da concentração de ácido ascórbico em suco de maçã Gala em tempos diferentes de exposição ao ambiente.

Tempo		0 mg/100g (controle)	15 mg/100g	30 mg/100g	90mg/100g	120mg/100g	150mg/100g
Zero minutos	L*	84,9 ^{c A} ± 0,1	87,5 ^{b A} ± 0,1	88,6 ^{a A} ± 0,1	90,2 ^{a A} ± 0,1	90,2 ^{a A} ± 0,1	92,2 ^{a A} ± 0,1
	a*	8,4 ^{a B} ± 0,1	2,11 ^{b B} ± 0,1	1,1 ^{c A} ± 0,1	1,1 ^{c A} ± 0,1	1,2 ^{c A} ± 0,1	1,3 ^{c A} ± 0,1
	b*	39,5 ^{a C} ± 0,1	22,3 ^{b B} ± 0,1	18,8 ^{c A} ± 0,1	18,5 ^{c A} ± 0,1	16,3 ^{c A} ± 0,1	12,6 ^{d A} ± 0,1
	Croma	40,3 ^{a C} ± 0,1	22,4 ^{b B} ± 0,1	18,9 ^{c A} ± 0,1	18,5 ^{c A} ± 0,1	16,3 ^{c A} ± 0,1	12,6 ^{d B} ± 0,1
	Hue (°)	77,9 ^{b B} ± 0,1	84,5 ^{a B} ± 0,1	86,5 ^{a A} ± 0,1	86,5 ^{a A} ± 0,1	85,8 ^{a A} ± 0,1	84,1 ^{a A} ± 0,1
30 minutos	L*	79,6 ^{c B} ± 0,1	87,0 ^{b A} ± 0,1	88,1 ^{a A} ± 0,1	90,6 ^{a A} ± 0,1	89,9 ^{a A} ± 0,1	91,9 ^{a A} ± 0,1
	a*	8,4 ^{a B} ± 0,1	2,24 ^{b B} ± 0,1	1,2 ^{c A} ± 0,1	1,2 ^{c A} ± 0,1	1,2 ^{c A} ± 0,1	1,3 ^{c A} ± 0,1
	b*	53,3 ^{a B} ± 0,1	22,5 ^{b B} ± 0,1	19,1 ^{c A} ± 0,1	18,4 ^{c A} ± 0,1	18,2 ^{c A} ± 0,1	12,9 ^{d A} ± 0,1
	Croma	54,5 ^{a B} ± 0,1	22,6 ^{b B} ± 0,1	19,1 ^{c A} ± 0,1	18,5 ^{c A} ± 0,1	16,3 ^{c A} ± 0,1	12,9 ^{d B} ± 0,1
	Hue (°)	81,1 ^{c A} ± 0,1	84,3 ^{b B} ± 0,1	86,9 ^{a A} ± 0,1	86,6 ^{a A} ± 0,1	85,6 ^{a A} ± 0,1	83,7 ^{a A} ± 0,1
	Índice de escurecimento	68,0 ^{a B} ± 0,1	27,4 ^{b B} ± 0,1	20,1 ^{c A} ± 0,1	20,0 ^{c A} ± 0,1	21,3 ^{c A} ± 0,1	19,8 ^{c A} ± 0,1
60 minutos	L*	77,9 ^{c C} ± 0,1	85,4 ^{b B} ± 0,1	88,8 ^{a A} ± 0,1	90,2 ^{a A} ± 0,1	89,9 ^{a A} ± 0,1	91,8 ^{a A} ± 0,1
	a*	9,7 ^{a A} ± 0,1	2,75 ^{b A} ± 0,1	1,2 ^{c A} ± 0,1	1,1 ^{c A} ± 0,1	1,2 ^{c A} ± 0,1	1,3 ^{c A} ± 0,1
	b*	58,3 ^{a A} ± 0,1	25,4 ^{b A} ± 0,1	19,4 ^{c A} ± 0,1	18,1 ^{c A} ± 0,1	16,9 ^{c A} ± 0,1	12,8 ^{c A} ± 0,1
	Croma	59,1 ^{a A} ± 0,1	25,5 ^{b A} ± 0,1	19,4 ^{c A} ± 0,1	19,9 ^{c A} ± 0,1	18,8 ^{c A} ± 0,1	17,9 ^{c A} ± 0,1
	Hue (°)	80,5 ^{b A} ± 0,1	83,8 ^{b A} ± 0,1	86,2 ^{a A} ± 0,1	86,6 ^{a A} ± 0,1	85,7 ^{a A} ± 0,1	83,7 ^{b A} ± 0,1
	Índice de escurecimento	131,9 ^{a A} ± 0,1	33,2 ^{b A} ± 0,1	21,0 ^{c A} ± 0,1	20,8 ^{c A} ± 0,1	20,6 ^{c A} ± 0,1	21,0 ^{c A} ± 0,1

Nota: Resultados expressos com média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05) de acordo com o teste de Fisher LSD.

A partir de uma concentração de 30 mg/100g de ácido ascórbico, durante um período de 60 minutos, não há diferença significativa entre a luminosidade dos sucos, parâmetros a^* e b^* , intensidade de cor ou variações na tonalidade, medida pelo ângulo *hue*. Tal fato indica que não há o escurecimento do suco, ocasionado pela oxidação fenólica, tornando eficaz a atividade antioxidante do ácido ascórbico, a partir desta concentração. Ademais, em um período de 60 minutos (em 30 mg/100g ou mais), não há escurecimento do suco da cultivar Gala, com um índice de escurecimento constante (média de 20,1).

Figura 16. Sucos no tempo zero e após 60 minutos em exposição ao ambiente



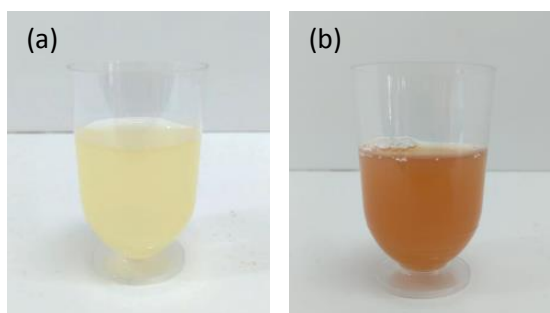
Nota: concentrações em de ácido ascórbico: (a): controle; (sem adição) (b): 15 mg/100g; (c): 30 mg/100g; (d): 60 mg/100g; (e): 90 mg/100g; (f): 120 mg/100g; (g): 150 mg/100g.

Fonte: O autor (2019).

Além da ação antioxidante, o ácido ascórbico por ser um agente redutor, é eficaz em reduzir quinonas. Estas, formadas na oxidação fenólica, reduzem-se à difenóis incolores estáveis antes destes se transformarem em pigmentos escuros, as melanoidinas (SAPERS; MILLER, 1998). No entanto, esta ação é temporária, uma vez que em um determinado momento todo o conteúdo de ácido ascórbico presente será oxidado e perderá, assim, sua eficiência contra a ação da PPO (LOZANO-DEGONZÁLEZ; DRUDIS-BISCARRI; IBARZ-RIBAS, 1994). A seleção 170/25, com 29,2 mg/100g de ácido ascórbico, possui o menor escurecimento de polpa (Tabelas 3 e 4). No entanto, o suco da cultivar Gala, adicionado de

concentração de ácido ascórbico semelhante ao da 170/25 (30 mg/100g), após um período de 150 minutos, apresentou parâmetros de cor e índice de escurecimento enzimático semelhante ao suco controle, sem adição de antioxidantes (Croma = 60,0 e índice de escurecimento = 168,8) (Figura 16). Após um intervalo de tempo de reação, todo o ácido ascórbico encontra-se em sua forma oxidada (ácido dehidroascórbico) saturando o meio. Assim, o composto perde sua atividade antioxidante, liberando os sítios ativos enzimáticos para reagir com os compostos fenólicos específicos, ocasionando o escurecimento enzimático. Então, a concentração de ácido ascórbico elevada na seleção 170/25 pode ser efetiva em retardar a ação das enzimas PPO e POD em um intervalo de tempo determinado. Porém, o escurecimento tardio após 150 minutos, na seleção híbrida em questão, ocorre pela fração proteica a qual compõe as enzimas ser reduzida, com uma proporção de sítios ativos livres inferior à quantidade de substrato fenólico presente, o que explica o escurecimento ser tardio em um intervalo de tempo maior.

Figura 17. Suco de maçã Gala com 30 mg/100g logo após o processamento e após 150 minutos



Nota: (a): Suco não oxidado, logo após o processamento; (b): Suco oxidado a 150 min após o processamento. Fonte: O autor (2019).

2.3.3. Determinação do teor fenólico total e atividade antioxidante em maçãs híbridas e comerciais

O estudo da composição de maçãs e seus produtos, nos últimos anos, se deve aos benefícios relacionados à presença dos compostos bioativos e sua ação antioxidante (ZIELINSKI et al., 2014; ALBERTI et al., 2016; ALVAREZ et al., 2017).

Tabela 7. Teores fenólicos e atividade antioxidante, em base seca, de maçãs híbridas e comerciais.

Cultivares	Fenóis Totais (mgEAC/kg)	Flavonoides Totais (mgECAT/kg)	DPPH ($\mu\text{molTE/kg}$)	FRAP ($\mu\text{molTE/kg}$)	ABTS ($\mu\text{molTE/kg}$)
Gala	3056 ^f $\pm$ 66	2377 ^h $\pm$ 6	25855 ^{bc} $\pm$ 73	24117 ^{de} $\pm$ 115	19834 ^{bc} $\pm$ 57
Fuji	3473 ^{de} $\pm$ 76	1407 ^k $\pm$ 82	24777 ^{bcd} $\pm$ 150	25228 ^c $\pm$ 258	19797 ^{bc} $\pm$ 217
Red Delicious	3627 ^{cd} $\pm$ 86	2482 ^g $\pm$ 21	24312 ^{de} $\pm$ 95	23302 ^e $\pm$ 275	19302 ^{de} $\pm$ 298
Granny Smith	4395 ^b $\pm$ 39	3215 ^b $\pm$ 37	26169 ^b $\pm$ 146	26468 ^{ab} $\pm$ 224	19898 ^{bc} $\pm$ 131
Monalisa	3890 ^c $\pm$ 37	2520 ^{fg} $\pm$ 23	26174 ^b $\pm$ 226	23820 ^e $\pm$ 139	19364 ^{de} $\pm$ 290
Elenise	2990 ^f $\pm$ 74	2164 ⁱ $\pm$ 13	24335 ^{cd} $\pm$ 90	24080 ^{de} $\pm$ 118	19116 ^{ef} $\pm$ 113
Maxi Gala	3429 ^{cd} $\pm$ 47	2418 ^h $\pm$ 60	24311 ^{de} $\pm$ 112	24135 ^{de} $\pm$ 119	19821 ^{bc} $\pm$ 140
170/23	2902 ^g $\pm$ 76	1222 ^l $\pm$ 20	23698 ^e $\pm$ 184	23648 ^e $\pm$ 309	18411 ^g $\pm$ 257
170/25	2946 ^g $\pm$ 37	2048 ^j $\pm$ 19	21149 ^f $\pm$ 137	22098 ^f $\pm$ 262	18733 ^{fg} $\pm$ 245
170/30	4417 ^b $\pm$ 74	2619 ^e $\pm$ 58	25169 ^{bcd} $\pm$ 131	25654 ^{bc} $\pm$ 192	20316 ^a $\pm$ 183
170/32	4637 ^b $\pm$ 38	3175 ^{bc} $\pm$ 48	24237 ^{de} $\pm$ 275	24413 ^b $\pm$ 289	19896 ^{bc} $\pm$ 119
170/40	3319 ^{ef} $\pm$ 98	2565 ^{ef} $\pm$ 11	26051 ^{bc} $\pm$ 118	25172 ^c $\pm$ 324	19673 ^{cd} $\pm$ 107
170/91	4966 ^a $\pm$ 120	3319 ^a $\pm$ 32	27595 ^a $\pm$ 175	27005 ^a $\pm$ 201	19240 ^e $\pm$ 170
170/114	3066 ^f $\pm$ 66	2982 ^d $\pm$ 19	24458 ^{cd} $\pm$ 128	25117 ^c $\pm$ 137	20044 ^{abc} $\pm$ 237
170/116	3868 ^c $\pm$ 63	3129 ^c $\pm$ 34	26223 ^b $\pm$ 146	25209 ^c $\pm$ 103	20069 ^{ab} $\pm$ 164
170/118	3671 ^{cd} $\pm$ 112	2924 ^d $\pm$ 23	24776 ^{bcd} $\pm$ 258	25005 ^{cd} $\pm$ 239	19821 ^{bc} $\pm$ 156

Nota: Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Fisher LSD. ¹ Resultados em miligramas de equivalentes de ácido clorogênico por quilograma de fruta; ² Resultados em miligramas de equivalentes de catequina por quilograma de fruta; ³ Resultados em micromol de equivalentes de Trolox por quilograma de fruta.

Entre as 16 cultivares estudadas, para compostos fenólicos totais, os resultados variaram de 2902 a 4966 mgEAC/kg, com destaque para as frutas da seleção 170/91 e Granny Smith. A oscilação na composição fenólica relaciona-se com a cultivar, o estágio de maturação, local geográfico, condições de ambiente de cultivo das plantas (SHAHIDI, 2012; ZHAO et al., 2013). Em maçãs da cultivar Fuji Suprema, Alberti et al. (2017) obtiveram valores entre 453,85-5194,08 mgEAC/kg. Zardo et al. (2015), em 36 cultivares de maçãs comerciais, polinizadoras e seleções avançadas, reportam resultados variando de 456 a 1583 mg/kg, expressos em equivalentes de catequina.

Para flavonoides totais, a variação dentre as frutas analisadas foi de 1222-3319 mgECAT/kg, com ênfase, novamente, às cultivares 170/91 e Granny Smith com os maiores teores. Em maçãs tradicionais da região do Himalaia, Bahukhandi et al. (2018) obtiveram valores para flavonoides de 1020,0 - 9860,0 mg/kg.

Em relação à atividade antioxidante, para o método de captura do radical DPPH, os resultados variaram de 21149 - 27595 $\mu\text{molTE/kg}$ (Tabela 7). Em análises da cultivar Golden Delicious, Fernández-Jalao, Sánchez-Moreno e De Ancos (2018), obtiveram resultados de 22140-24560 $\mu\text{molTE/kg}$.

Para a análise do método de redução do ferro, FRAP, os resultados contidos na Tabela 6 variaram de 22098 - 27005 $\mu\text{molTE/kg}$. Para Bahukhandi et al. (2018), a faixa de resultados obtida foi de 4700 - 39210 $\mu\text{molTE/kg}$. Para Fernández-Jalao, Sánchez-Moreno e De Ancos (2018), os resultados da atividade antioxidante por FRAP variaram de 19570,0 a 26980,0 $\mu\text{molTE/kg}$. O teor de compostos fenólicos pode ser correlacionado diretamente com a atividade antioxidante da matriz estudada. Conforme maior o teor fenólico, maior a ação antioxidante dos compostos (HAMINIUK et al., 2012). Sendo assim, em relação aos resultados entre as 16 cultivares obtidas, há uma correlação positiva entre a análise de FRAP com o teor de fenóis totais e flavonoides totais, com $r \geq 0,621$ e $r \geq 0,550$, respectivamente.

A atividade antioxidante aferida pelo método de descoloração do cátion ABTS, variou de 18411 - 20316 $\mu\text{molTE/kg}$. Nos estudos de Bahukhandi et al. (2018), os resultados oscilaram de 3100,0 - 67360,0 $\mu\text{molTE/kg}$. O teor médio, na atividade antioxidante de maçãs Golden Delicious, por Fernández-Jalao, Sánchez-Moreno e De Ancos (2018), foi de 33920,0 $\mu\text{molTE/kg}$. Foram obtidas correlações positivas entre a ação oxidante desde método e os teores de fenóis e flavonoides totais, com, respectivamente, $r \geq 0,329$ e $r \geq 0,361$.

Atividades antioxidantes superiores, implicam em maiores teores de compostos fenólicos capazes de romper reações em cadeia decorridas do estresse oxidativo. Frutos com uma maior atividade antioxidante implicam em benefícios uma vez ingeridos, com a diminuição da incidência de doenças crônicas não transmissíveis (HAMINIUK et al., 2012; ZIELINSKI et al., 2014). Quanto às reações metabólicas do fruto vinculadas à sua proteção, o escurecimento enzimático tende a ser maior, uma vez que os compostos fenólicos em teores elevados são os substratos diretos da enzima PPO. Contudo, se essa condição se implica em frutos com atividades enzimáticas diminutas, a relação entre compostos fenólicos e a velocidade de escurecimento enzimático torna-se um equívoco. O fator que limita o fenômeno do escurecimento enzimático, no estudo em questão, é a proporção dos sítios ativos enzimáticos não ser equivalente aos fenóis, diminuindo a velocidade de ligação destes e a formação de melanoidinas como produto final da reação, ser reduzida.

As maçãs das seleções híbridas 170/23 e 170/25 apresentaram os menores valores em composição fenólica e em relação à atividade antioxidante. São as frutas em que a ação oxidativa enzimática é ínfima, resultando em um escurecimento enzimático tardio. O baixo teor de fenóis totais pode estar relacionado com uma menor concentração dos principais substratos da enzima PPO e POD. Assim, a velocidade da reação no sítio ativo proteico é menor, levando a uma alteração diminuta na cor da polpa. No entanto, devido à ação enzimática ocorrer em compostos fenólicos específicos, uma quantificação individual dos mesmos é fundamental para relacionar o escurecimento tardio com os compostos bioativos do fruto.

2.3.4 Identificação e quantificação do perfil fenólico de maçãs

A quantificação dos compostos individuais em maçãs se deve à variação da cultivar, grau de maturação, condições climáticas, ambiente de plantio e condições de extração fenólica. O perfil destes compostos fenólicos está relacionado com a adstringência, amargor, cor e aroma de maçãs e seus produtos (ALBERTI et al., 2014; FÉVRIER et al., 2017; LEE; CHAN; MITCHELL, 2017).

Tabela 8. Perfil fenólico de maçãs híbridas e comerciais.

Cultivar	Compostos fenólicos individuais (mg/kg)											
	CQA	CAT	EPI	PB2	QGA	QGL	QRH	QAR	QXI	PLZ	FXI	ANT
Gala	300,8 ⁱ ± 0,2	57 ^a ±2	*	34 ⁱ ± 1	39 ^k ± 1	27 ^{cd} ± 2	24 ^g ± 1	17,0 ^g ± 0,2	25,4 ^b ± 0,1	102,7 ^l ± 0,1	111 ^{cd} ± 1	3,6 ^k ± 0,1
Fuji	554,1 ^d ± 0,3	32,83 ^b ±0,05	*	203 ^f ± 3	62,0 ^{ijk} ± 0,5	21 ^{de} ± 0,1	24,9 ^g ± 0,2	25 ^f ± 1	15 ^c ± 2	253,5 ^d ± 0,1	70,4 ^{fg} ± 0,1	2 ^l ± 1
Red Delicious	234,9 ^j ± 0,1	*	*	134,3 ^h ± 0,5	*	*	*	*	*	91,9 ^m ± 0,2	*	*
Granny Smith	119 ^m ± 1	*	*	431,6 ^b ± 0,1	100 ^g ± 2	35,4 ^{bc} ± 0,6	49,4 ^e ± 0,3	27,9 ^e ± 0,1	22,5 ^b ± 0,3	81 ⁿ ± 1	167,8 ^b ± 0,4	*
Monalisa	844,9 ^a ± 0,3	53,0 ^a ±0,1	207,3 ^d ± 0,5	*	82,3 ^{hij} ± 0,1	43 ^{ab} ± 3	122 ^a ± 2	19,2 ^g ± 0,3	24,1 ^b ± 0,4	130,9 ^k ± 0,3	77,3 ^{efg} ± 0,3	10 ^g ± 1
Elenise	64,22 ⁿ ± 0,01	20 ^b ±4	*	17 ⁱ ± 3	131,4 ^f ± 0,4	34,4 ^{bc} ± 2	39 ^f ± 1	36 ^d ± 2	30 ^b ± 1	131,6 ^k ± 0,5	61,3 ^g ± 0,1	*
Maxi Gala	495,9 ^e ± 0,6	61 ^a ±1	*	250,3 ^e ± 0,1	174 ^{cd} ± 3	27,4 ^{cd} ± 5	40,5 ^f ± 0,1	46,4 ^b ± 0,1	26 ^b ± 2	141,6 ^j ± 0,1	106,1 ^{de} ± 0,1	21 ^c ± 1
170/23	193 ^k ± 2	*	341 ^c ± 49	231,9 ^e ±32	82 ^{ghi} ± 1	18,1 ^{de} ± 0,1	44,5 ^f ± 0,6	41,5 ^c ± 0,4	21,3 ^b ± 0,1	165 ⁱ ± 6	57,9 ^{gh} ± 0,1	4,7 ⁱ ± 0,1
170/25	711 ^c ± 1	*	42 ^f ± 4	*	49,5 ^{jk} ± 0,3	17,6 ^{de} ± 0,1	56,7 ^{cd} ± 0,6	35,2 ^d ± 0,7	79 ^a ± 9	203,2 ^f ± 0,2	160,7 ^b ± 0,4	7,3 ⁱ ± 0,1
170/30	408 ^g ± 11	*	535 ^b ± 52	326,7 ^d ± 0,8	184,7 ^{bc} ± 0,5	35,7 ^{bc} ± 0,4	93 ^b ± 2	66 ^a ± 1	34 ^b ± 0,1	223,9 ^e ± 0,5	201,8 ^a ± 0,4	13,4 ^e ± 0,2
170/32	335 ^h ± 4	*	514 ^b ± 9	406,4 ^c ± 0,6	251,3 ^a ± 0,9	48,9 ^a ± 0,4	92 ^b ± 2	40,2 ^c ± 0,8	28,7 ^b ± 0,5	399,3 ^b ± 0,4	142,1 ^{bc} ± 0,4	32,9 ^a ± 0,1
170/40	184,7 ^l ± 0,3	*	296 ^c ± 44	173 ^g ± 4	154 ^{de} ± 5	27,4 ^{cd} ± 0,8	50 ^e ± 3	36 ^d ± 1	23 ^b ± 2	353 ^c ± 4	96 ^{def} ± 2	*
170/91	725,6 ^b ± 0,3	*	861,2 ^a ± 0,4	480 ^a ± 8	91,2 ^{gh} ± 0,8	16,4 ^e ± 0,1	54 ^d ± 1	24,1 ^f ± 0,8	19,1 ^b ± 0,1	440 ^a ± 2	171,3 ^{ab} ± 0,3	11,9 ^f ± 0,1
170/114	489 ^f ± 7	*	522 ^b ± 20	133,7 ^h ± 0,6	206,8 ^b ± 0,1	33,2 ^{bc} ± 0,4	57,9 ^c ± 0,3	44,3 ^b ± 0,5	22,1 ^b ± 0,1	184,2 ^g ± 0,3	97,8 ^{def} ± 0,1	8,4 ^h ± 0,1
170/116	185 ^l ± 1	*	139 ^e ± 7	170,4 ^g ± 0,2	84 ^{fgh} ± 1	19 ^{de} ± 2	44 ^f ± 5	29 ^e ± 4	20,9 ^b ± 0,1	180,7 ^h ± 0,1	111 ^{cd} ± 1	17,3 ^d ± 0,1
170/118	337 ^h ± 6	*	119 ^e ± 2	338,5 ^d ± 0,3	85,3 ^{ghi} ± 0,02	21,4 ^{de} ± 0,1	38,4 ^f ± 0,1	24 ^f ± 1	14 ^c ± 1	128 ^k ± 1	113 ^{cd} ± 2	23,0 ^b ± 0,1

Nota: CQA: ácido clorogênico; CAT: (+)-catequina; EPI: (-)-epicatequina PB2: procianidina B2; QGA: quercetina-3-D-galactosídeo; QGL: quercetina-3-β-D-glucosídeo; QRH: quercetina-3-ο-ramnosídeo; QAR: quercetina-3-ο-arabinofuranosídeo; QXI: quercetina-3-ο-xilosídeo; PLZ: floridzina; FXI: floretina-xiloglucosídeo; ANT: antocianinas totais; *: teores abaixo do limite de quantificação (LOQ); Diferentes letras na mesma coluna representam diferença estatística por Fischer LSD.

Entre os ácidos fenólicos, os teores de ácido clorogênico oscilaram de 184,7-844 mg/kg para 16 cultivares analisadas. De acordo com estudos em cultivares de mesa (Fuji, Golden Delicious, Granny Smith e Pink Lady), os resultados variaram de 67,3-781,7 mg/kg (LEE; CHAN; MITCHELL, 2017). Para Alberti et al. (2014), em maçãs da cultivar comercial Gala, o teor médio de ácido clorogênico foi de 55,34 mg/100g. Por ser um composto hidrofílico, o ácido clorogênico é encontrado em grandes proporções em maçãs e principalmente em seus respectivos sucos (LEE; CHAN; MITCHELL, 2017; FERNÁNDEZ-JALAO; SÁNCHEZ-MORENO; DE ANCOS, 2019). Em produtos derivados da fruta, a presença de ácidos fenólicos contribui na atividade antioxidante, sabor, cor e acidez dos mesmos (ALONSO-SALCES et al., 2004).

A cultivar Monalisa apresentou os maiores teores de ácido clorogênico e, de acordo com as análises abordadas neste trabalho, esta fruta obteve um maior escurecimento da polpa. Como essa cultivar apresenta uma elevada atividade enzimática, em comparação às seleções híbridas, explica o fato do índice de escurecimento ser elevado, uma vez que o principal substrato da reação oxidativa encontra-se em maior evidência nessa cultivar. Um dos maiores teores de ácido clorogênico está na composição da maçã 170/25 (711 mg/kg) e, como discutido, apresentou o menor escurecimento de sua polpa. Por mais que o principal substrato enzimático da PPO e POD esteja em evidência na composição da fruta, devido à atividade enzimática ser pequena, o escurecimento enzimático torna-se tardio. Não há, portanto, uma proporção equivalente de sítios ativos enzimáticos para ligação química ao substrato específico, diminuindo, assim, a velocidade de reação. A cultivar Red Delicious, em especial, apresentou os menores teores entre todos os compostos fenólicos individuais, devido sua relação mesocarpo/epicarpo ser maior em relação às demais cultivares de mesa.

Dentre os flavan-3-óis, os teores de catequina (Tabela 7) variaram de 20-61 mg/kg, para (-)- epicatequina 207,3-861,2 mg/kg e, para procianidina B2, 17-480 mg/kg. Segundo Alberti et al. (2014), os teores médios destes flavonoides, na cultivar comercial Gala, foram de 10,54 mg/100g para catequina, 25,56 mg/100g para epicatequina e 39,53 mg/100g para procianidina B2. Estes compostos, da subclasse fenólica em questão, estão relacionados com a alta atividade antioxidante, antimicrobiana, além de contribuir no sabor, aroma e cor de maçãs e seus produtos (ERLUND, 2004; OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, estes fenóis são um dos principais substratos da enzima PPO e POD. A (+)-catequina e (-)- epicatequina, quando oxidadas, geram compostos que são altamente reativos com os demais polifenóis, as

quinonas. Estas se ligam quimicamente às procianidinas e ocorre uma reação em cadeia de oxidação da maioria dos compostos fenólicos (LIU et al., 2010). Novamente, a cultivar Monalisa destaca-se do conjunto estudado com a maior quantificação de catequina em sua composição. Assim como o ácido clorogênico, o alto teor de catequina somado ao fato da atividade enzimática da fruta ser elevada, explica o fato do maior índice de escurecimento desta cultivar.

Para os flavonóis, foram identificados e quantificados os principais glicosídeos de quercetina em maçãs nas cultivares em estudo. Em destaque, a quercetina-3-D galactosídeo, com resultados oscilando entre 39-251 mg/kg. Segundo pesquisas relacionadas ao perfil fenólico de maçãs comerciais, dentre todos os derivados glicosilados de quercetina, a quercetina-3-D-galactosídeo é o mais predominante em maçãs (LIAUDANSKAS et al., 2015) e, de acordo com estudos da variedade Gala, o teor médio é de 87,6 mg/kg (ALBERTI et al., 2014). No entanto, a quercetina-3-O rutinosídeo, apresenta, em média, os menores teores em relação à composição dos flavonóis em maçãs, com 9,9-19,2 mg/kg (SCHIEBER, 2001; LIAUDANSKAS et al., 2015). Neste trabalho, o flavonol quercetina-3-O-rutinosídeo detectado apresentou teores inferiores ao limite de quantificação da análise. Apenas para as cultivares Fuji e Granny Smith foi possível a quantificação deste composto (23,9 e 36,5 mg/kg, nesta ordem). Para as demais cultivares, a quercetina-3-O-rutinosídeo foi identificada, porém com teores abaixo do limite de quantificação. Os glicosídeos de quercetina, em geral, estão relacionados às funções benéficas ao organismo. Dentre elas, a intensa atividade antioxidante e ação anticancerígena, com redução da incidência de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (HEIM et al., 2002; LIAUDANSKAS et al., 2015).

Da subclasse das dihidrochalconas, os resultados de floridzina oscilaram de 81-440 mg/kg e, este fenol é considerado um biomarcador de espécies pertencentes à família *Rosaceae*, a qual abrange o gênero *Malus* (TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000; ALBERTI et al., 2017). Sendo assim, maçãs e seus produtos devem conter este representante das dihidrochalconas em seu perfil fenólico. Em cultivares de maçãs comerciais, o teor médio obtido em estudos, aproxima-se de 111,2 mg/kg (ALBERTI et al., 2014; MA et al., 2019). Para a floridzina-xiloglucosídeo, dentre os teores da Tabela 8, a oscilação dos mesmos foi de 61,3-201,8 mg/kg. Segundo os teores de cultivares de mesa, na literatura, há uma variação de 24,26 - 42,61 mg/kg (FERNÁNDEZ-JALAO, I.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; DE ANCOS, 2019). De acordo com estudos a partir de componentes relacionados ao escurecimento enzimático de sucos de maçãs e sidras, as

dihidrochalconas também são precursores de compostos que também são oxidados pela enzima PPO. A dihidrochalcona glicosilada floretina – xiloglucosídeo deriva compostos de tonalidade amarelada a partir da consequente oxidação enzimática (LE DEUN et al., 2015). A presença de dihidrochalconas livres ou glicosiladas, na composição de maçãs, é de grande importância devido a sua ação antioxidante e antimicrobiana, inibição de células carcinogênicas, além de reduzir a ação bioquímica do metabolismo de micro-organismos *gram* negativos (BARRECA et al., 2014; WU et al., 2018).

Em geral, as seleções híbridas avaliadas apresentaram os principais compostos fenólicos individuais, também detectados em cultivares de maçãs comerciais. Dentre os mesmos, foram detectados e quantificados os principais substratos da enzima PPO e POD. No entanto, o escurecimento enzimático tardio, evidenciado nas frutas 170/23 e 170/25, é ocasionado devido à baixa atividade enzimática. Todavia, a ação do ácido ascórbico é limitada a um curto período de tempo, e consequentemente a causa deste menor escurecimento é a baixa atividade enzimática. Devido à segregação decorrente dos processos de melhoramento, a fração proteica a qual as enzimas pertencem, pode ter sido reduzida, evidenciada pela baixa oxidação dos compostos fenólicos nas frutas das seleções híbridas avaliadas.

2.4 CONCLUSÃO

As maçãs híbridas 170/23 e 170/25, de acordo com as análises discutidas, apresentaram um menor escurecimento enzimático. Os principais compostos fenólicos individuais quantificados em maçãs comerciais também foram identificados e mensurados nas frutas híbridas. A maçã 170/25, em especial, obteve um dos maiores teores do principal substrato enzimáticos, o ácido clorogênico. As seleções híbridas apresentaram um tamanho semelhante às cultivares comerciais, contribuindo para uma futura comercialização destas frutas na forma *in natura*. O potencial de mercado das seleções híbridas 170/23 e 170/25, em destaque, torna-se interessante, pois são atrativas sensorialmente na comercialização de minimamente processados e, no processamento industrial, evitam a necessidade da adição de inibidores de ações oxidativas, além da permanência dos compostos fenólicos e sua ação antioxidante.

CAPÍTULO 3

ASPECTOS TECNOLÓGICOS DO SUCO DE CULTIVARES DE MAÇÃS COM ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO TARDIO

3.1 INTRODUÇÃO

Da produção mundial de maçãs, cerca de 65% está voltada para o processamento de sucos, sendo este o segundo mais consumido no mundo (SCHULZE et al., 2014; FAOSTAT, 2018). Nos países onde a fruta é destinada à produção de sucos, estes são classificados como integrais, orgânicos, clarificados, concentrados e reconstituídos (ALVAREZ et al., 2017).

Durante o processamento, diversas operações unitárias são utilizadas, como etapas de seleção, sanitização, cominuição, prensagem, despectinização concentração ou pasteurização (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2018). Nestas etapas, há o rompimento da célula vegetal, os compostos fenólicos presentes nos vacúolos celulares são transferidos para o suco e são oxidados pelas enzimas PPO e POD. Esta oxidação ocorre em uma velocidade maior no suco do que na fruta *in natura*, devido à área de contato maior com o oxigênio, além do fato da maioria dos ácidos fenólicos, substratos enzimáticos, serem transferidos para o suco (LE BOURVELLEC; GUYOT; RENARD, 2009).

O escurecimento enzimático e não enzimático, em frutas e sucos, são os dois principais fenômenos que ocasionam mudança na coloração e formação de *off-flavors*. Estes são derivados de aldeídos e acetaldeídos, como glioxal, metilglioxal, diacetil e acetoína (HEMACHANDRAN et al., 2017; PARAVISINI; PETERSON, 2018). A atividade enzimática pode ser controlada, durante o processamento, com adição de inibidores, antioxidantes e/ou tratamento térmico, todavia, estas operações levam às mudanças sensoriais indesejáveis ao produto (RAMALHO; JORGE, 2006).

No entanto, as cultivares melhoradas, com o escurecimento enzimático tardio, geram apelo industrial e nutricional, devido não haver a necessidade de aditivos químicos e a manutenção dos compostos fenólicos. Sendo assim, o capítulo a seguir visa analisar sucos provenientes de maçãs híbridas, correlacionar sua composição ao escurecimento enzimático tardio, assim como compará-los aos sucos de maçãs comerciais.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

Foram utilizadas as maçãs das cultivares Maxi Gala, Monalisa, Elenise, assim como 9 maçãs melhoradas geneticamente (códigos 170/23, 170/25, 170/30, 170/32, 170/40, 170/91, 170/114, 170/116 e 170/118) pelo Programa de Melhoramento da Macieira da EPAGRI, unidade de Caçador (26°50'11,68" S 50°58'23,41"O, 947 m acima do nível do mar), Santa Catarina, Brasil. As cultivares, já lançadas ao mercado, Elenise e Monalisa, também foram desenvolvidas pela unidade experimental da EPAGRI, cujos frutos provenientes das plantas resultaram em fenótipos interessantes ao comércio *in natura*, além da resistência ao clima e defensivos agrícolas. As maçãs comerciais das cultivares Gala, Fuji, Red Delicious e Granny Smith foram obtidas no comércio da cidade de Ponta Grossa (25° 05' 42'' S 50° 09' 43'' O) Paraná, Brasil. Os reagentes utilizados, assim como os padrões para análises químicas foram os mesmos listados no Capítulo 2 (item 2.2.1).

3.2.2. Métodos

3.2.2.1 Processamento dos sucos de maçã

Antes do processamento das frutas, para todas as cultivares foi determinado o ponto de maturação de todas as maçãs pelo teste de iodo-amido, com a utilização de uma solução de Lugol 1% (BLANPIED; SILSBY, 1992; GIRARDI et al., 2002).

As maçãs foram selecionadas, sanitizadas (solução à 200 mg/L de cloro ativo por 15 minutos) e enxaguadas para retirar o excesso de cloro aderido ao epicarpo das frutas. As frutas inteiras foram processadas em multiprocessador de alimentos (Metvisa, Brasil) e a massa triturada foi inicialmente prensada a 0,25 kgf/cm² por 5 minutos, em malha de poliestireno, seguida de prensagem a 3 kgf/cm² por 2 minutos em prensa hidráulica (Hoppe Ind. Ltda., Gravataí, RS, Brasil). O suco obtido foi despectinizado com a adição de enzimas pectinolíticas (Pectinex® Ultra Clear, LNF Bento Gonçalves e Novozymes Latin America, RS, Brazil) na concentração de 3,0 mL/hL a 45°C por 60 minutos. Após transcorrido o tempo, realizou-se uma trasfega e os sucos foram identificados e armazenados a -18°C, até o momento das análises.

O rendimento dos sucos foi realizado de acordo com uma relação entre a massa inicial de frutas e o total de volume de suco correspondente. O cálculo foi realizado de acordo com a equação:

$$\% \mu = \left(\frac{vf}{mi} \right) \times 100$$

$\% \mu$ = Rendimento, em porcentagem de suco obtido;

vf = Volume final de suco, em litros;

mi = Massa inicial das maçãs, em quilogramas.

3.2.2.2 Determinação do escurecimento enzimático em sucos de maçã

Para a avaliação do escurecimento enzimático nos sucos de maçãs das cultivares estudadas, as frutas foram trituradas em multiprocessador de alimentos (Metvisa, Brasil) e em seguida prensadas (0,25 kgf/cm² em malha de poliestireno, por 2 minutos). O suco obtido foi centrifugado (MPW Med. Instruments, modelo MPW-351, 600 W, Varsóvia, Polônia) a 2660_g por 10 minutos e, logo em seguida, foi realizada a análise colorimétrica, com a adição do suco em cubeta de quartzo, (CM-5-ID, KONICA MINOLTA, Japão) para obtenção dos parâmetros L*, a* e b* e cálculo do *Browning Index*, sendo o cálculo deste demonstrado no Capítulo 2. Os parâmetros foram medidos, nos primeiros 10 minutos de análise, a cada 30 segundos devido à taxa inicial de escurecimento ser intensa. Após este período, os parâmetros de cor foram medidos em um intervalo de tempo maior, a cada 10 minutos, durante 60 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para a obtenção de um suco não oxidado (tempo zero / controle), foi adicionada à 500g de maçã triturada 100mg de uma mistura de antioxidantes, a qual era constituída de metabissulfito de potássio 96% (LABSYNTH, Diadema, São Paulo) e de ácido ascórbico 99% (ANIDROL, Diadema, São Paulo) em uma proporção de 1:1.

3.2.2.3 Análises físico-químicas dos sucos de maçã

Nas amostras de sucos foi determinado o pH (Tec-3MP, TECNAL) em pHmetro previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. A análise de acidez total titulável foi realizada com o método por titulometria de neutralização com hidróxido de

sódio (NaOH 0,1N) até o pH 8,33, do indicador fenolftaleína. O cálculo foi expresso como g de ácido málico/ 100 mL de suco de acordo com o IAL (2008). O teor de sólidos solúveis totais das amostras foi determinado, a 20°C, por refratometria, com o auxílio de um refratômetro ABBE (R 1000S, Megabrix, Brasil) e os resultados foram expressos em porcentagem de sólidos solúveis (g/100mL) ou °Brix.

3.2.2.4 Determinação da composição fenólica e atividade antioxidante dos sucos de maçã

As análises realizadas, com curvas padrão previamente preparadas, foram descritas e detalhadas no Capítulo 2 (ítem 2.2.2.8 e 2.2.2.9). Seguindo os mesmos parâmetros nos extratos da fruta inteira, para o suco, foi realizada a análise de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, de acordo com Singleton e Rossi (1965) com resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido clorogênico por litro de suco (mgEAC/L). Para flavonoides totais, segundo a metodologia de Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999), os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina por litro de suco (mgECAT/L).

Para a determinação da atividade antioxidante dos sucos de maçãs, foram realizadas as seguintes análises: método da captura do radical livre DPPH de acordo com Brand- Willams, Cuvelier e Berset (1995), poder de redução do ferro por FRAP segundo Benzie e Strain (1996) e o método de descoloração do radical ABTS por Re *et al.* (1999). Os resultados foram expressos em micromol de equivalentes de Trolox por litro de suco de maçã ($\mu\text{molTE/L}$).

3.2.2.5 Análises Estatísticas

Todas as análises dos sucos foram realizadas em triplicatas, com cálculo de médias, desvio padrão e coeficiente de variação. Para avaliar a homogeneidade das variâncias entre amostras, foi realizado o teste de Levene. Para verificação de diferenças significativas, foi aplicado o teste de ANOVA fator único, seguido de Fisher LSD. Para determinar a correlação entre os parâmetros estudados, foi utilizado o teste de Pearson (r). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA 7.0 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Determinação das características físico-químicas dos sucos de maçã

Os sucos provenientes de maçãs comerciais e seleções híbridas foram analisados e as características físico-químicas se encontram na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados físico-químicos dos sucos de maçã oxidados.

Cultivares	Rendimento do suco (%)	pH	Acidez (g/100mL ácido málico)	Sólidos solúveis (°Brix)
Gala	75,76	3,91 ^b ± 0,01	0,33 ^g ± 0,01	13 ± 1 ^f
Fuji	67,61	3,66 ^d ± 0,02	0,39 ^b ± 0,01	13,2 ± 0,1 ^d
Red Delicious	56,32	4,02 ^a ± 0,01	0,38 ^{bc} ± 0,01	10,4 ± 0,1 ^j
Granny Smith	63,10	3,38 ^g ± 0,01	0,29 ^h ± 0,01	12,2 ^g ± 0,1
Monalisa	71,67	3,13 ^l ± 0,01	0,43 ^a ± 0,01	15,2 ^a ± 0,3
Elenise	73,67	3,44 ^f ± 0,03	0,37 ^{cd} ± 0,01	14,5 ± 0,1 ^b
Maxi Gala	57,87	3,79 ^c ± 0,02	0,32 ^g ± 0,01	14,5 ^b ± 0,1
170/23	72,39	3,21 ^k ± 0,02	0,29 ^h ± 0,01	11,1 ± 0,1 ⁱ
170/25	69,44	3,25 ^j ± 0,01	0,37 ^{cde} ± 0,02	14,0 ^c ± 0,1
170/30	59,84	3,30 ⁱ ± 0,02	0,38 ^{cd} ± 0,02	13,1 ^d ± 0,1
170/32	74,05	3,47 ^e ± 0,02	0,23 ^j ± 0,01	12,8 ± 0,4 ^f
170/40	65,26	3,20 ^k ± 0,01	0,38 ^{cd} ± 0,02	11,7 ^h ± 0,1
170/91	58,32	3,28 ⁱ ± 0,01	0,37 ^{cd} ± 0,01	12,0 ^g ± 0,1
170/114	68,34	3,34 ⁱ ± 0,01	0,35 ^f ± 0,01	12,2 ^g ± 0,1
170/116	63,11	3,40 ^g ± 0,01	0,26 ⁱ ± 0,02	12,0 ^g ± 0,1
170/118	66,10	3,35 ^h ± 0,01	0,36 ^{ef} ± 0,01	13,2 ^d ± 0,1

Nota: Resultados expressos com média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05) de acordo com Fisher LSD.

O rendimento dos sucos depende de cada cultivar e é fortemente relacionado com o tamanho dos frutos e tecnologia de extração. Em estudos de métodos de extração diferenciados, Vendruscolo et al. (2012) obteve, para as cultivares Fuji e Golden Delicious, um aproveitamento médio de suco de 70,35% e 63,44% sendo, respectivamente, o maior e menor rendimento obtido pelos autores. Segundo Huang et al. (2018), trabalhos foram realizados em cultivares híbridas oriundas do cruzamento de variedades chinesas e comerciais, entre elas Fuji e Golden Delicious. O rendimento médio obtido entre estas maçãs foi de, aproximadamente, 52%. O rendimento de suco, entre as

16 cultivares analisadas variou de 56,32-75,76%. Em média, a capacidade de produção de suco das maçãs comerciais foi de 66,57% e, para as nove seleções híbridas, 66,31%. Isso indica que, para o processamento de sucos, as frutas híbridas se assemelham às comerciais, em volume de suco. Sendo assim, também é uma característica notória para o destino destas frutas a indústrias de sucos e fermentados.

O teor de sólidos solúveis, expresso em gramas de soluto por 100 mL de suco (°Brix) indica a concentração, principalmente, dos maiores componentes solúveis: açúcares e ácidos orgânicos com valores médios, para o suco de maçã, de 11,6 e 0,37 g/100 mL, respectivamente (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2018). A variação deste parâmetro foi de 11,0-15,2 °Brix, com destaque para a cultivar comercial Monalisa, com 15,2 °Brix, enquanto o suco da híbrida 170/23, 11,1°Brix, apresentando menor concentração de sólidos ao suco. Em sucos da cultivar Golden Delicious, Alongi et al. (2018) obtiveram uma média de 13,70°Brix, para sólidos solúveis. De acordo com Wosiacki e Nogueira (2018), o teor de sólidos solúveis, entre maçãs comerciais, variou de 8,9-16,4 °Brix e, segundo os autores, o teor de sólidos solúveis é um indicativo do estágio de maturação do fruto para processamento. Conforme a FDA- “*Food and Drug Administration*” (2018), o teor mínimo de sólidos solúveis estabelecido para processamento de sucos em maçãs é de 11,5°Brix.

A acidez, cujos resultados estão na Tabela 9, variou de 0,23-0,43 g/100mL de suco expresso em ácido málico. Este é o principal ácido orgânico presente em maçãs, correspondendo a mais de 90% da acidez total da fruta (ETIENNE et al., 2013). De acordo com Alberti et al. (2016), a acidez do suco é relacionada com o estágio de maturação da fruta. Quanto maior o estágio de maturação, maior a concentração de açúcares, uma vez que amilases endógenas hidrolisam o amido presente na composição do fruto. Segundo os autores, que estudaram a composição de sucos e sidras com estádios de maturação diferentes, a acidez variou de 0,16-0,47 g/100mL em cultivares Gala, Lis Gala e Fuji Suprema. Frutos em um maior estágio de maturação contém menores teores de ácidos. No entanto, neste trabalho, o estágio de maturação de todas as frutas analisadas foi padronizado. As quatro variedades adquiridas no comércio de Ponta Grossa (Gala, Fuji, Red Delicious e Granny Smith) apresentaram uma acidez média de 0,35 g/100 mL. Quanto as nove seleções híbridas, a acidez média foi de 0,33 g/100 mL. Estes resultados também potencializam as frutas híbridas ao comércio *in natura* e ao processamento. Em relação ao pH, a faixa em que se encontram as maçãs das seleções híbridas e das cultivares comerciais é de 3,25-4,02. Wosiacki e Nogueira (2018), dentre um amostral de 124

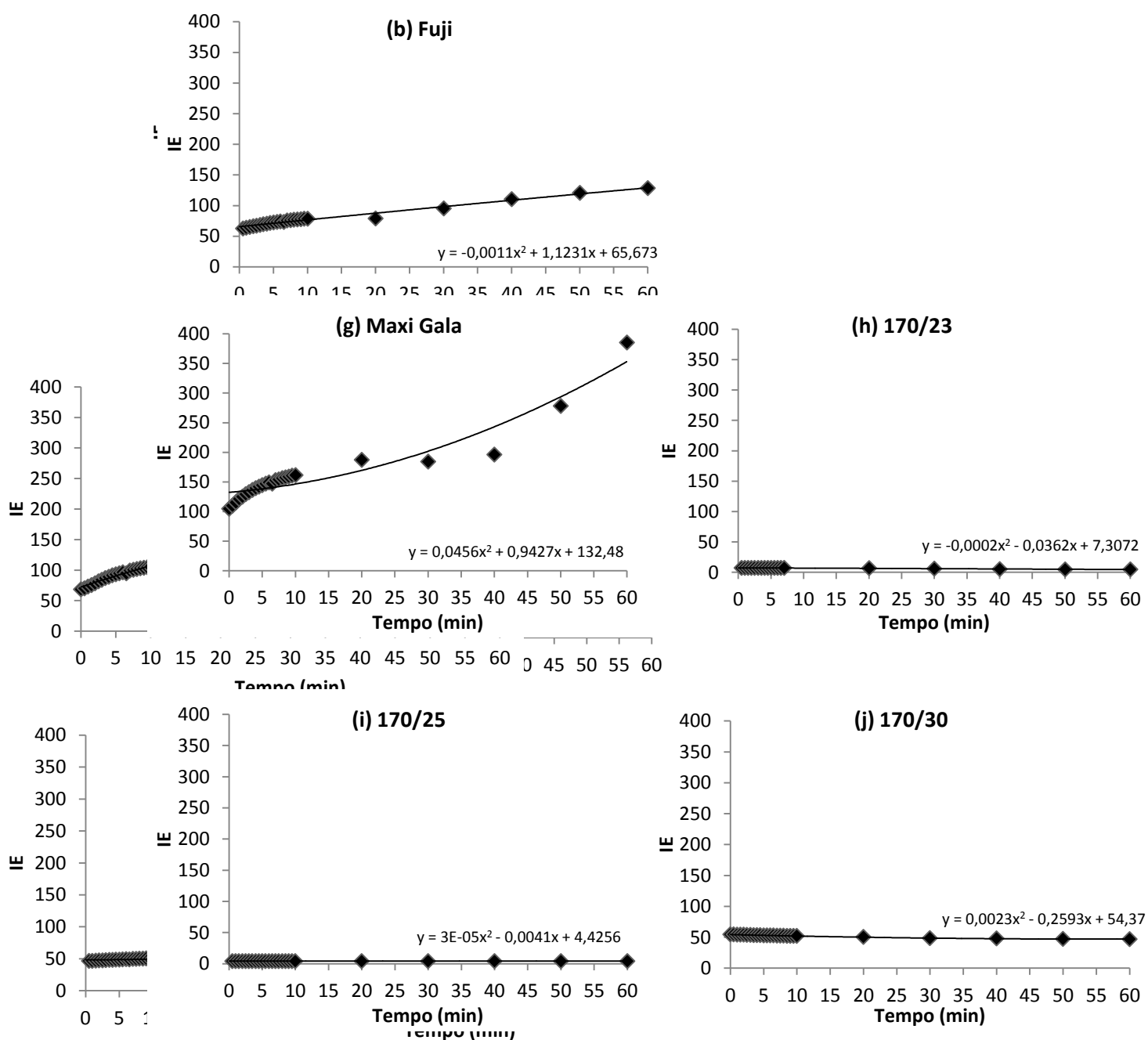
cultivares de maçã, comerciais, polinizadoras e seleções melhoradas, obtiveram uma faixa de pH dos sucos entre 2,91-4,33.

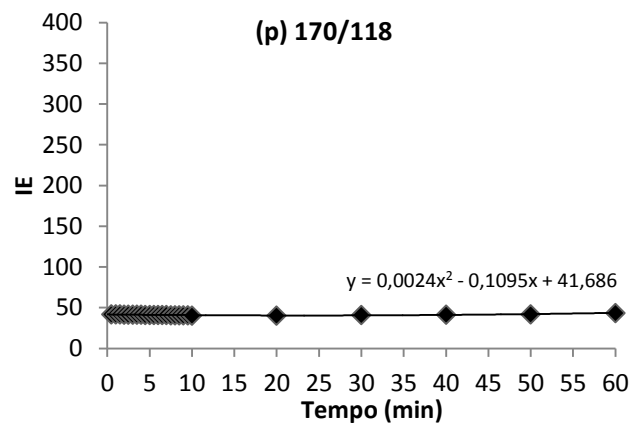
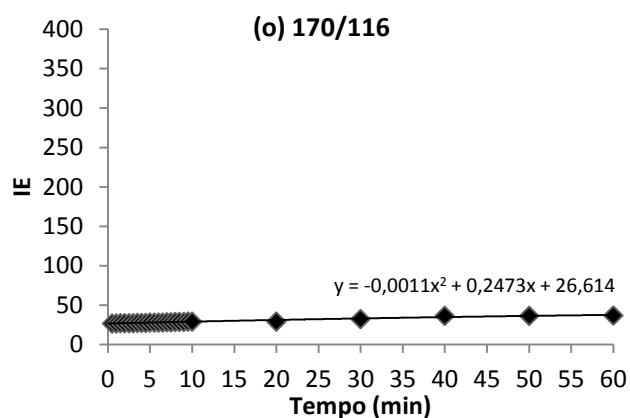
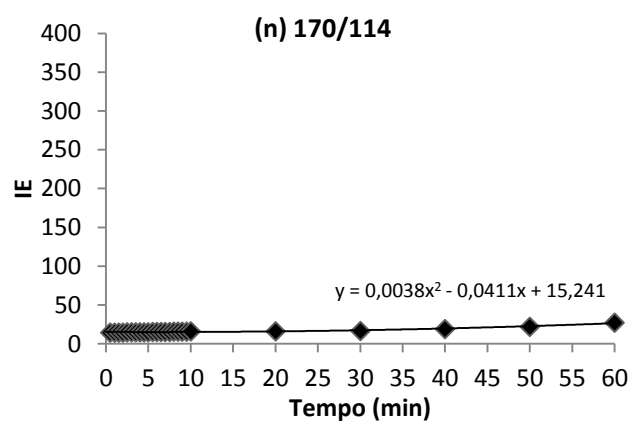
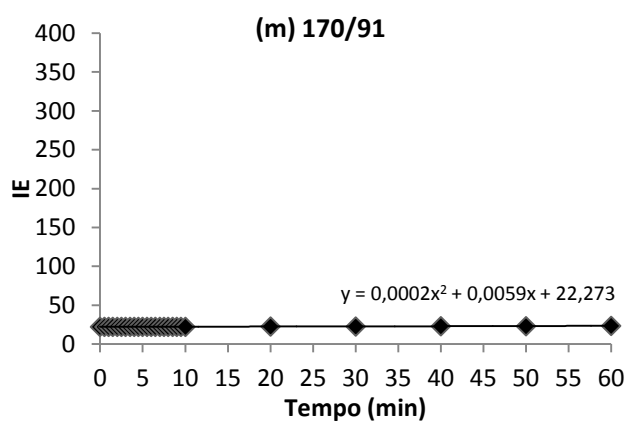
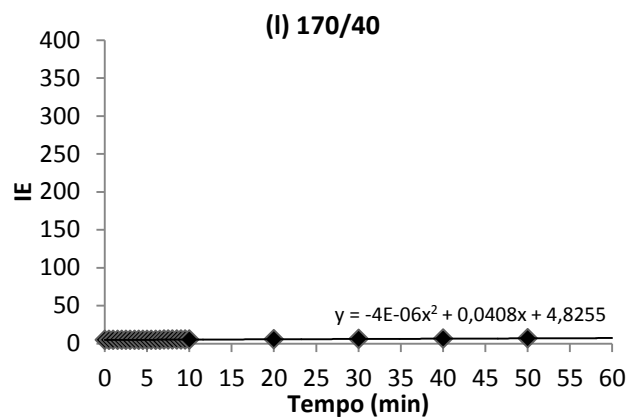
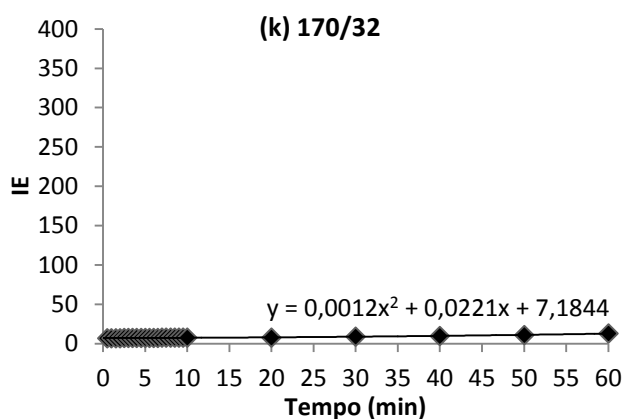
É importante ressaltar que a ação catalítica da enzima PPO ocorre em uma faixa de pH geralmente entre 4,0-8,0. Esta faixa de pH varia de acordo com a matriz estudada, métodos de extração e purificação da enzima, além de soluções tampão utilizadas (JIANG; ZAUBERMAN; FUCHS, 1997; SIDDIQ; SINHA; CASH, 1992; DOGAN; DOGAN, 2004). Em maçãs, o pH ótimo de atuação da PPO é entre 3,5-4,0 e 4,5 para a POD (MARQUES et al., 1995; SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2008). Os sucos cujo pH foi maior e que se aproximam do ideal para a ação das enzimas PPO e POD, são das cultivares Red Delicious (4,02), Gala (3,91) e Maxi Gala (3,79). Para estas cultivares observou-se uma das maiores atividades enzimáticas, discutidas no Capítulo 2 (sessão 2.3.2), sendo observado um maior escurecimento de suas polpas. Já as híbridas 170/23 e 170/25, de menor pH dos sucos, 3,21 e 3,25, respectivamente, apresentaram maior concentração de ácido ascórbico nas frutas e menores atividades enzimáticas (capítulo 2).

3.3.2. Determinação do escurecimento enzimático em sucos de maçã

A análise para determinação do escurecimento enzimático, nos sucos de maçãs comerciais e seleções híbridas aqui estudadas, é semelhante à realizada na fruta inteira, referentes ao Capítulo 2. Na Tabela 10 estão apresentados os resultados do índice de escurecimento do suco bruto não oxidado, com parâmetros obtidos logo em seguida ao processamento, e após 60 minutos expostos ao oxigênio do ambiente. O índice de escurecimento enzimático em função do tempo de análise, para os sucos de cada cultivar estudada, é apresentado na Figura 18.

Figura 18. Índice de escurecimento enzimático (IE) para sucos de maçã comerciais e seleções híbridas ao longo de 60 minutos.





Nota: $R^2 = 0,9219$ (a); $0,9761$ (b); $0,9946$ (c); $0,7508$ (d); $0,9728$ (e); $0,9659$ (f); $0,906$ (g); $0,951$ (h); $0,893$ (i); $0,996$ (j); $0,985$ (k); $0,998$ (l); $0,974$ (m); $0,963$ (n); $0,963$ (o); $0,893$ (p).

Tabela 10. Índice de escurecimento e parâmetros de cor de sucos não oxidados e oxidados após 60 minutos.

Cultivares	Suco não oxidado (tempo zero)					Suco oxidado após 60 minutos					
	L*	a*	b*	Croma	Hue (°)	L*	a*	b*	Croma	Hue (°)	IE
Gala	99,7 ^a A ± 0,1	3,5 ^a B ± 0,1	33,9 ^a B ± 0,4	34,2 ^a B ± 2	84 ^c A ± 1	64 ^g B ± 1	24 ^a A ± 6	74 ^a A ± 19	78 ^a A ± 1	72,3 ^f B ± 0,3	384 ^a ± 3
Fuji	98 ^a A ± 1	3,2 ^a B ± 0,2	33,1 ^a B ± 0,3	34,7 ^a B ± 0,1	96,3 ^b A ± 3	85 ^f B ± 2	6 ^{de} A ± 7	55 ^b A ± 2	55 ^b A ± 6	84 ^{cd} B ± 2	108,4 ^c ± 3
Red Delicious	74,5 ^c A ± 0,2	0,4 ^d B ± 2	38 ^a B ± 2	37 ^a B ± 2	89 ^c A ± 1	52 ^h B ± 6	10 ^b A ± 3	42 ^c A ± 4	42,9 ^c A ± 0,1	75,8 ^e B ± 0,6	178 ^b ± 3
Granny Smith	65 ^d A ± 1	1,8 ^b B ± 0,1	24,1 ^b B ± 0,1	24 ^b B ± 1	85,7 ^c A ± 0,2	55,6 ^g B ± 0,1	9 ^c A ± 2	28 ^e A ± 3	29 ^{ef} A ± 2	72 ^f B ± 5	88 ^d ± 5
Monalisa	96 ^b A ± 2	-0,4 ^e B ± 0,1	2,4 ^d B ± 0,1	24,4 ^b B ± 0,3	100 ^a A ± 2	86 ^f B ± 1	6 ^d A ± 2	43 ^c A ± 13	43 ^c A ± 3	82,4 ^d B ± 0,5	76 ^d ± 10
Elenise	97 ^{ab} A ± 0,1	-0,5 ^e B ± 0,1	21 ^b B ± 3	12 ^{bc} B ± 1	81,2 ^c B ± 0,1	93,8 ^{bc} B ± 0,2	2 ^{ghi} A ± 7	27 ^e A ± 2	27 ^{fg} A ± 1	89,2 ^a A ± 0,3	34 ^{ef} ± 2
Maxi Gala	99 ^a A ± 3	3 ^a B ± 2	5 ^c B ± 1	32,1 ^a B ± 0,1	91,1 ^A ± 0,1	65,2 ^g B ± 0,4	24 ^a A ± 8	76 ^a A ± 3	79,5 ^a A ± 0,6	72,2 ^f B ± 0,4	385 ^a ± 5
170/23	98 ^a A ± 1	-0,4 ^e B ± 0,1	3,9 ^{cd} B ± 0,2	3,9 ^{cd} B ± 0,1	97 ^b A ± 1	95,3 ^b B ± 0,1	2 ^{ghi} B ± 2	8 ^g A ± 5	8,6 ⁱ A ± 0,4	75,8 ^e B ± 0,4	4,8 ⁱ ± 0,5
170/25	99,3 ^a A ± 0,2	-0,4 ^e B ± 1	2 ^d A ± 2	2,2 ^d A ± 0,1	101,5 ^a A ± 1	98,6 ^a A ± 0,1	0,8 ^j A ± 2	2 ^h A ± 8	3,0 ^j A ± 0,3	49,2 ^g B ± 0,1	4,4 ⁱ ± 0,1
170/30	99 ^a A ± 2	-0,4 ^e B ± 0,2	3,9 ^{cd} B ± 0,1	34,1 ^a A ± 0,1	97,1 ^b A ± 0,3	91,7 ^{cd} B ± 0,7	2 ^{hi} A ± 1	34 ^d A ± 11	33,8 ^d A ± 0,1	86,9 ^{ab} B ± 0,1	47,5 ^e ± 0,2
170/32	98,7 ^a A ± 0,1	0,2 ^d B ± 0,1	2 ^d B ± 2	7,8 ^c B ± 0,1	98,1 ^{ab} A ± 1	93 ^{bcd} B ± 3	2,7 ^{gh} B ± 0,1	8,7 ^g A ± 0,1	18,2 ^h A ± 0,4	72,6 ^f B ± 0,8	13,1 ^{ghi} ± 0,6
170/40	99 ^a A ± 2	0,4 ^d B ± 0,2	1 ^d B ± 1	6,7 ^c B ± 0,1	98,5 ^{ab} A ± 0,1	95,5 ^b B ± 0,8	2 ^{ghi} A ± 1	4 ^h A ± 3	19 ^h A ± 2	85 ^{bc} A ± 3	12 ^h ± 3
170/91	98 ^a A ± 1	1 ^c B ± 2	3,2 ^{cd} B ± 0,3	7,8 ^c B ± 0,1	97,6 ^b A ± 0,1	89 ^e B ± 1	5 ^{ef} A ± 2	15 ^f A ± 6	16 ^h A ± 1	73 ^f B ± 5	24 ^{fgh} ± 1
170/114	99,4 ^a A ± 0,3	0,3 ^d B ± 0,1	5,6 ^c B ± 1	4,9 ^c B ± 0,1	98,3 ^{ab} A ± 0,1	91 ^{de} B ± 3	4 ^f A ± 2	18 ^f A ± 6	18,3 ^h A ± 0,2	77 ^e B ± 3	27 ^g ± 2
170/116	99 ^a A ± 1	-0,4 ^e B ± 0,1	5 ^c B ± 2	5 ^c B ± 2	97,9 ^{ab} A ± 0,2	92 ^{cd} B ± 2	3 ^g A ± 2	25 ^e A ± 7	25 ^g A ± 5	84 ^{cd} B ± 3	36 ^{ef} ± 1
170/118	99 ^a A ± 2	-0,4 ^e B ± 0,1	8,9 ^c B ± 0,1	14 ^{bc} B ± 1	96 ^b A ± 1	92 ^{cd} B ± 1	1 ^{ij} A ± 2	31 ^d A ± 10	31 ^{de} A ± 1	87,7 ^{ab} B ± 0,1	43 ^e ± 2

Nota: IE= índice de escurecimento. Resultados expressos com média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05) de acordo com Fisher LSD.

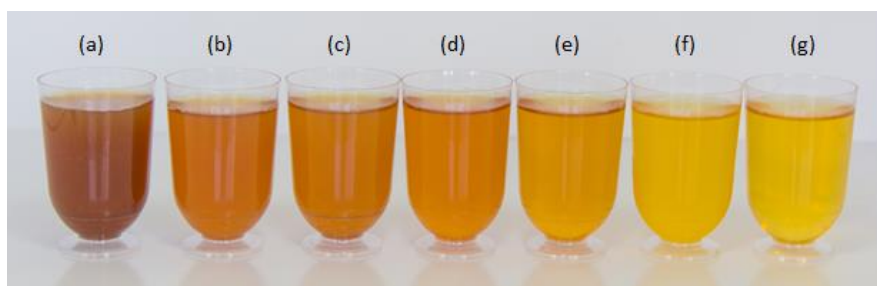
De acordo com o índice de escurecimento em função do tempo dos sucos das cultivares analisadas (Figura 18), destacam-se, com um escurecimento expressivo, a Maxi Gala e Gala. O escurecimento enzimático ocorre de maneira instantânea à medida que os substratos fenólicos são expostos ao oxigênio molecular em poucos minutos, com a formação direta de quinonas e transformação sucessiva em melanoidinas. A mudança da cor após o processamento de sucos se intensifica devido à ação da enzima PPO ser expressiva em uma maior área de contato com o oxigênio. Ademais, os ácidos fenólicos, substratos da enzima, são transferidos em sua maioria para o suco, tornando este produto mais susceptível ao escurecimento enzimático do que a fruta intacta. Assim, a variação de cor dos sucos oxidados depende da cultivar, composição fenólica além da intensidade do processo oxidativo dos compostos fenólicos (NICOLAS et al., 1994; LE DEUN et al., 2015; FÉVRIER et al., 2017). O índice de escurecimento expressa a variação na mudança de cor em relação a cada tempo de medição (NICOLAS et al., 1994). Quando o escurecimento é máximo, com um total preenchimento dos sítios ativos enzimáticos pelos substratos fenólicos, o parâmetro em função do tempo torna-se constante, pois a variação de cor em relação a um ponto anterior é nula ou insignificante. Nota-se que apenas para os sucos de escurecimento mais expressivo (Maxi Gala e Gala), mesmo após 60 minutos de análise, o índice de escurecimento é progressivo, com uma tendência a obtenção de valores maiores após o decorrer da análise. De acordo com a sessão 2.3.2, as cultivares Maxi Gala e Gala apresentaram uma das maiores atividades da enzima PPO, com uma maior disponibilidade de sítios ativos para se ligar a um máximo de compostos fenólicos e concentração maior de melanoininas. Além disso as barreiras sólidas (epicarpo, mesocarpo, endocarpo) são transferidas ao bagaço, tornando toda a amostra sucessiva à ação oxidativa de forma homogênea, o que difere da fruta inteira na qual a reação ocorria superficialmente.

Um escurecimento menos expressivo, ao longo de 60 minutos, para as cultivares comerciais, foi observado para Granny Smith, Monalisa e Elenise. Dentre estas, as maçãs Granny Smith e Monalisa apresentaram menor atividade da enzima PPO, já para a cultivar Elenise, a atividade enzimática da PPO foi uma das menores de todo o conjunto. Para todas as seleções híbridas, em comparação com as comerciais, o escurecimento foi lento e menor durante todo o período de 60 minutos. Dentre as seleções híbridas, os sucos das maçãs 170/23, 170/25, 170/32 e 170/40 obtiveram os menores índices de escurecimento entre os 16 sucos. No entanto, para os sucos das seleções 170/23 e 170/25 ao longo de 60 minutos, o índice de escurecimento (ínfimo em relação às comerciais) teve uma variação

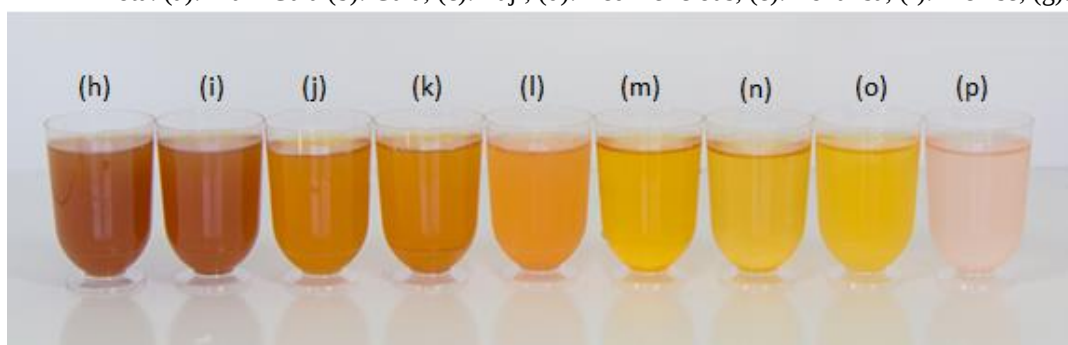
muito pequena desde os primeiros minutos de análise até a finalização da mesma. Estas duas frutas, de acordo com a sessão 2.3.2, foram as que apresentaram uma atividade enzimática muito pequena em relação às comerciais. Assim, mesmo com uma área superficial maior com o oxigênio e maior concentração dos principais substratos enzimáticos na fração líquida, devido à atividade enzimática ser baixa, a oxidação dos compostos fenólicos é pequena e, assim, a concentração de melanoidinas também será baixa, com uma variação insignificante do índice de escurecimento e obtenção de sucos de tonalidade clara.

O escurecimento ocasionado em sucos de frutas diminui o valor nutricional dos mesmos além de prejudicar a qualidade dos produtos devido às reações oxidativas. No entanto, em sucos clarificados de maçã, a cor amarelada proveniente do escurecimento, torna-se um atrativo ao consumidor (LEE et al., 2016). Além disso, em sucos e fermentados, a reação enzimática torna-se precursora no desenvolvimento de aromas e sabores, diminuindo a adstringência do produto final, uma vez que os principais compostos fenólicos responsáveis por esta característica, catequina e epicatequina, são substratos da PPO e POD (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003). O índice de escurecimento final dos sucos das maçãs analisadas variou de 4,4 a 384. As fotos dos sucos oxidados, das 16 variedades estudadas, estão apresentadas na Figura 19, na qual é muito perceptível as variações na coloração aos 60 minutos após o processamento das frutas.

Figura 19. Sucos despectinizados oxidados das maçãs comerciais e seleções híbridas 60 minutos após o processamento.



Nota: (a): Maxi Gala (b): Gala; (c): Fuji; (d): Red Delicious; (e): Monalisa; (f): Elenise; (g):

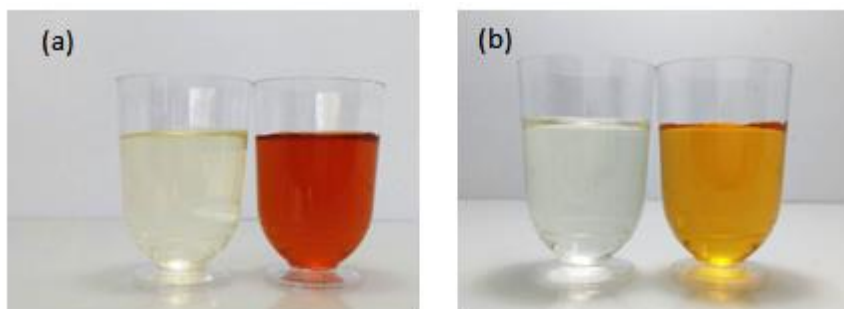


Granny Smith; (h): 170/116; (i): 170/32; (j): 270/30; (k): 170/118; (l): 170/114; (m): 170/91; (n): 170/40; (o): 170/23; (p): 170/25.

Fonte: O autor (2018).

Em comparação com o suco não oxidado, as cultivares Gala e Maxi Gala apresentaram o maior índice de escurecimento ($IE=384,7$). A luminosidade (L^*) reduziu, nestas duas variedades comerciais, em 55% e 51%, respectivamente. Além do mais, a intensidade da cor (Croma), de seus sucos aumentou em 128% para a Gala e 148% para a Maxi Gala. A variação na intensidade do escurecimento dos sucos destas duas cultivares após 60 minutos está ilustrada na Figura 20:

Figura 20. Sucos não oxidados e oxidados das cultivares Maxi Gala e Gala



Nota: (a): Suco da cultivar Maxi Gala não oxidado (à esquerda) e oxidado após 60 minutos de exposição ao ambiente (à direita); (b): idem para a cultivar Gala.

Fonte: O autor (2018).

Em trabalhos com processamento de sucos da cultivar Golden Delicious, Alongi et al. (2018) obteve valores médios, para luminosidade (L^*) e ângulo *hue*, de 51 e 70, respectivamente. Lee et al. (2016), em sucos da cultivar Red Delicious, obteve média de resultados de 52,6 para L^* , 1,44 para a tonalidade a^* e 7,66 para b^* . Marszalek et al. (2018), em sucos de maçã recém extraídos, os valores médios foram 57,9 para L^* , 2,9 para a^* e 4,6 para b^* . Segundo Le Deun et al. (2015), cujos valores de L^* oscilaram de 84,9-97,3. O alto valor das médias deste parâmetro é resultado de tratamentos realizados ao suco antes das análises, como despectinização, microfiltração e centrifugação, tornando o mesmo mais límpido.

Vale salientar, novamente, que os sucos brutos deste trabalho foram homogeneizados e expostos ao oxigênio do ambiente por 60 minutos e, de forma equivalente para todas as maçãs, um menor índice de escurecimento foi observado para as maçãs híbridas 170/23 e 170/25, com 4,4 e 4,8, respectivamente. Para os sucos das maçãs comerciais, de escurecimento mais expressivo, o índice de escurecimento das duas híbridas em destaque corresponde a, apenas, 1,2% daquelas. Em comparação aos sucos não oxidados, a luminosidade (L^*) das amostras de suco da maçã 170/23 e 170/25 reduziu, apenas, em 2% e 0,7%, nesta ordem. Para a intensidade de cor (Croma), houve um aumento de 20% e 36%, para a 170/23 e 170/25. Este fato torna-se uma característica interessante ao processamento, devido à permanência dos compostos bioativos e intensificação do valor nutricional do produto.

A cultivar 170/25, além de denotar o escurecimento tardio de sua polpa, suco e baixa atividade enzimática, apresentou uma coloração final róseo-clara de seu respectivo suco oxidado, com a média do parâmetro a^* 0,8 (Figura 21). Segundo Février et al. (2017), em estudos de maçãs de polpa vermelha, os sucos oriundos destas estão

relacionados com altos valores do parâmetro a^* , com uma média de 60. No entanto, o suco não oxidado da fruta 170/25 resulta em uma tonalidade clara, com uma média de -0,4 para a^* . Após o intervalo de tempo de 60 minutos, a coloração é modificada em tons de rosa. Devido a isso, a exposição prolongada ao oxigênio resulta na tonalidade atípica deste suco, indicando que a cor é consequência de reações oxidativas de compostos da fruta. A cor rosada do suco da fruta 170/25 é uma característica instigante e, até então, recente no processamento de maçãs. Esta propriedade manteve-se mesmo após o congelamento do produto a -18°C e sucessivos descongelamentos.

Figura 21. Suco não oxidado e oxidado da seleção híbrida 170/25.



Nota: Suco não oxidado (à esquerda); Suco oxidado (à direita). Fonte: O autor (2018).

3.3.3. Determinação da composição fenólica e atividade antioxidante de sucos de maçã

O teor de fenóis totais (Tabela 11) variou de 568 a 1264,3 mgEAC/L. De acordo com o estudo de sucos de maçã de polpa vermelha por Février et al. (2017), a variação obtida foi de 279 a 2373 mgEAC/L. O teor de compostos fenólicos, em sucos de maçã, modifica-se de acordo com a cultivar, estágio de maturação, condições climáticas e tipo de processamento utilizado (ALBERTI et al., 2016; FÉVRIER et al., 2017).

Tabela 11. Composição fenólica e atividade antioxidante de sucos oxidados de maçã comerciais e híbridas.

Cultivares	Fenóis Totais (mgEAC/L) ¹	Flavonoides Totais (mgECAT/L) ²	DPPH (μmolTE/L) ³	FRAP (μmolTE/L) ³	ABTS (μmolTE/L) ³
Gala	815,6 ^d ± 0,1	142,5 ^e ± 0,1	10447 ^c ± 134	1583 ^d ± 87	1750 ^f ± 9
Fuji	794 ^{de} ± 12	144 ^d ± 1	4111 ^h ± 134	831 ^j ± 124	194,7 ^l ± 0,1
Red Delicious	670 ^{gh} ± 9	109,3 ^k ± 0,5	7859 ^e ± 580	1270 ^{efg} ± 24	1344 ^h ± 4
Granny Smith	1127 ^b ± 54	198,5 ^b ± 0,7	13491 ^b ± 166	2263 ^b ± 14	3261 ^c ± 2
Monalisa	966 ^c ± 7	178 ^c ± 2	10407 ^c ± 93	1899 ^c ± 49	2012 ^e ± 13
Elenise	943 ^c ± 4	113,4 ⁱ ± 0,1	8811 ^d ± 45	1479 ^{def} ± 6	1763 ^f ± 6
Maxi Gala	768,2 ^{ef} ± 0,2	135,3 ^g ± 0,7	8087 ^e ± 688	1205 ^{ghi} ± 8	1069,7 ⁱ ± 0,1
170/23	568 ⁱ ± 21	112 ^j ± 1	8870 ^d ± 62	1242 ^{efg} ± 25	972 ^j ± 2
170/25	584 ⁱ ± 2	76,7 ^o ± 0,3	7036 ^f ± 284	990 ^{ij} ± 118	900 ^j ± 9
170/30	698 ^g ± 6	101,3 ^l ± 0,6	7561 ^{ef} ± 558	1127 ^{hi} ± 7	726 ^k ± 8
170/32	796 ^{de} ± 4	91,9 ^m ± 0,5	3773 ^h ± 104	585 ^k ± 100	7036 ^a ± 8
170/40	637 ^h ± 15	87,1 ⁿ ± 0,6	7740 ^e ± 283	1333 ^{efgh} ± 5	1122 ⁱ ± 2
170/91	1264,3 ^a ± 0,7	277,6 ^a ± 0,7	15306 ^a ± 51	3294 ^a ± 93	3174 ^d ± 60
170/114	825 ^d ± 17	122,5 ^h ± 0,8	8831 ^d ± 198	1440 ^{defg} ± 62	1414 ^{gh} ± 20
70/116	821 ^d ± 26	123,8 ^h ± 0,7	5182 ^g ± 147	757 ^{jk} ± 79	6722 ^b ± 7
170/118	758 ^f ± 12	139,1 ^f ± 2,0	9049 ^d ± 435	1524 ^{de} ± 7	1456 ^g ± 2

Nota: Resultados expressos com média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05) de acordo com o teste de Fisher LSD. ¹ Resultados em miligramas de ácido clorogênico por litro de suco; ² Resultados em miligramas de catequina por litro de suco; ³ Resultados em micromol de Trolox por litro de suco.

Em comparação com o teor fenólico total dos sucos obtidos, em análises do extrato da fruta inteira (Capítulo 2, sessão 2.3.3), a faixa média obtida é de 2902 a 4966 mgEAC/kg. Durante o processamento do suco, há uma redução de, aproximadamente, 30 a 50% dos compostos fenólicos, devido estes permanecerem aderidos à parede celular da fruta, por meio de interações químicas como pontes de hidrogênio. Logo, após a extração do suco, uma fração significativa destes compostos bioativos fica retida ao bagaço (GUYOT et al., 2003). Além disso, os compostos que são extraídos no suco são oxidados pelas enzimas PPO e POD em, aproximadamente, 20-60%. Assim, há a permanência de, no máximo, 10% da atividade antioxidante existente em frutas inteiras (BEGIĆ-AKAGIĆ et al., 2011).

O suco das maçãs 170/91 e Granny Smith, dentre todas as cultivares analisadas, foram as que se destacaram em relação ao teor de fenóis totais com 1264,3 e 1127 mgEAC/L, respectivamente. Persic et al. (2017), obtiveram também um maior teor destes

compostos para Granny Smith, com 600 mg/L. Este fato também foi observado por Zielinski et al. (2018) na mesma cultivar, com 873 mg EAC/L.

Para flavonoides totais, os teores obtidos variaram de 76,7- 277,6 mgECAT/L, com destaque, novamente, para as maçãs 170/91 e Granny Smith (277,6 e 198,5 mgECAT/L). De acordo com Alvarez et al. (2017), com estudos baseados na composição de sucos de maçã comerciais segundo sua origem geográfica, o teor de flavonoides totais para sucos de maçã integrais variou de 66-290 mgECAT/L. De acordo com Lee et al. (2016), em análises com sucos da cultivar Red Delicious, a variação foi de 60-150 mgECAT/L. Na subclasse dos flavonoides, os flavan-3-óis, contem como compostos principais a catequina e seu isômero epicatequina, procianidinas, responsáveis por gerar adstringência ao fruto e contribuir para a captura de radicais meio reativo devido à sua estrutura química (MATEOS et al., 1993; ROCHA; MORAIS,2001; LE DEUN et al., 2015). Os radicais pertencentes à estrutura destes flavan-3-óis são compatíveis ao sítio ativo da enzima PPO e POD (assim como a estrutura do ácido clorogênico), sendo um dos principais substratos e com o consequente escurecimento enzimático (MATEOS et al., 1993; ROCHA; MORAIS,2001).No entanto, como foi abordado no Capítulo 2 deste trabalho, o escurecimento enzimático observado nas frutas em estudo, está vinculado à variação da atividade enzimática entre todas as frutas, por mais que o substrato em questão esteja em maiores teores na fruta intacta ou suco.

Em relação à atividade antioxidante dos sucos, para a análise de DPPH, a variação ficou entre 3773-15305 $\mu\text{molTE/L}$. Alvarez et al. (2017), para sucos de maçã integrais, obtiveram a variação da atividade antioxidante por DPPH de 1012-9556 $\mu\text{molTE/L}$. De acordo com os mesmos autores, a maior atividade antioxidante pode ser relacionada com o maior teor de compostos fenólicos. Isso é confirmado pelo fato da cultivar Granny Smith e seleção híbrida 170/91 terem expressado a maior ação oxidante na análise de DPPH. Uma correlação positiva entre o teor de fenóis totais e a análise de DPPH é observada ($r \geq 0,882$), assim como para flavonoides totais ($r \geq 0,771$).

Para a análise de potencial antioxidante pelo método de FRAP, a variação dos resultados é de 757-3294 $\mu\text{molTE/L}$, com uma correlação positiva para fenóis totais e flavonoides totais: $r \geq 0,859$ e $r \geq 0,864$. A variação obtida por Alvarez et al. (2017) foi de 115-7335 $\mu\text{molTE/L}$. A concentração média, para sucos das cultivares Granny Smith e Red Delicious, por Zielinski et al. (2018), foi de 789,5 $\mu\text{molTE/L}$.

A atividade antioxidante, pela análise da descoloração do cátion ABTS, variou de 194,7-7036 $\mu\text{molTE/L}$, com correlação positiva para os teores das duas classes

fenólicas analisadas: $r \geq 0,772$ para fenóis totais e $r \geq 0,707$ para flavonoides totais. Também, para Alvarez et al. (2017), a faixa obtida pela análise de ABTS foi de 116-7335 $\mu\text{molTE/L}$.

Dentre todas as frutas analisadas, os sucos das seleções 170/23 e 170/25 apresentaram os menores teores fenólicos, com uma consequente baixa atividade antioxidante. Como discutido, os compostos fenólicos são os substratos diretos da enzima PPO e POD e o escurecimento da matriz ocorre na presença dos mesmos. De acordo com a sessão 2.3.2, as frutas com destaque para o teor fenólico e atividade antioxidante, 170/91 e Granny Smith, apresentaram uma atividade enzimática intermediária, com teores menores do que Monalisa e Maxi Gala (de maior escurecimento) e maiores que as duas seleções híbridas de escurecimento enzimático tardio (170/23 e 170/25). Por mais que o teor fenólico seja maior para a 170/91 e Granny Smith, uma vez que a atividade enzimática não esteja em mesma proporção que os fenóis, a reação ocorre em uma velocidade menor, no entanto, o escurecimento destas duas maçãs é mais evidente do que as seleções 170/23 e 170/25, cujas atividades enzimáticas foram mínimas em relação a todo o conjunto estudado.

A análise das principais classes de compostos fenólicos em maçãs, realizadas em frutos intactos e seus respectivos sucos, permite estimar o teor dos principais compostos pertencentes a cada classe, quantificados na sessão 2.3.4, em frutas inteiras. No entanto, para os sucos, a análise das classes somente, não é suficiente para relacionar com a menor ação enzimática, devido este fenômeno ocorrer em compostos específicos. Análises relacionadas à identificação e quantificação dos fenóis individuais devem ser realizadas para o suco proveniente das cultivares estudadas. Assim, haverá critérios de comparação entre o escurecimento tardio com a concentração dos componentes específicos para a atuação das enzimas PPO e POD.

3.4. CONCLUSÃO

O escurecimento enzimático tardio é evidenciado nos sucos oriundos das seleções híbridas 170/23 e 170/25. Em volume de suco são similares às maçãs de cultivares comerciais, sendo esta característica positiva para o destino das frutas ao processamento. Para a seleção 170/25, em especial, há o surgimento de uma coloração rosada de seu suco oxidado, uma característica até então inovadora em sucos de maçã. Em composição fenólica, apresentaram os menores teores dos compostos, assim como para a atividade antioxidante. Devido às características observadas e analisadas, um potencial tecnológico poderá ser aplicado nestas duas maçãs em destaque, com permanência dos compostos bioativos e diminuição da adição de insumos industriais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As modificações genéticas da maçã tem como finalidade a melhoria contínua da fruta para o produtor e consumidor final. O aumento na produtividade, além da resistência a pragas, doenças, melhor adaptação das plantas às oscilações do clima, são alguns dos inúmeros benefícios passíveis de serem alcançados. O melhoramento genético, que originou as maçãs híbridas estudadas, resultou em características interessantes a serem difundidas às futuras cultivares de maçã. As frutas das seleções 170/23 e 170/25, por exemplo, apresentaram menor e mais lento escurecimento da polpa e de seus respectivos sucos, com uma cor róseo-clara específica para o derivado da maçã 170/25. O teor de ácido ascórbico, também para estas duas frutas híbridas, foi superior em relação a todas as cultivares analisadas, influenciando na diminuição da velocidade da reação enzimática. Porém, o mesmo perde sua efetividade, com o tempo, devido às mudanças em sua ação oxido-redutora. Ademais, para a 170/23 e 170/25, as atividades das enzimas PPO e POD foram diminutas, correspondendo a, apenas, 19% e 2,3% das atividades em relação às comerciais, respectivamente. Para os teores das principais classes de compostos fenólicos em maçãs, tanto para o fruto intacto quanto para o suco das frutas 170/23 e 170/25, os menores resultados foram obtidos, assim como para a atividade antioxidante. Em todas as frutas híbridas da série 170, foram identificados e quantificados os principais compostos presentes em maçãs comerciais. Contudo, durante o processamento de sucos, os compostos fenólicos são reduzidos em 50%, aproximadamente, devido à retenção destes ao bagaço da fruta e à consequente reação oxidativa. Para o perfil fenólico, o ácido clorogênico, principal substrato da reação enzimática, apresentou um dos menores teores na seleção 170/25, a qual derivou um menor escurecimento em sua polpa e suco. Uma vez que os principais substratos enzimáticos apresentam concentração semelhante nas seleções híbridas (170/23 e 170/25) e nas cultivares comerciais, de escurecimento evidente, o fundamento do escurecimento enzimático tardio relaciona-se à presença de uma atividade enzimática baixa, tornando-se a principal causa da pequena velocidade do fenômeno. Então, no melhoramento genético e obtenção de novos híbridos, futuramente, a concentração enzimática das seleções 170/23 e 170/25 pode ser parâmetro para novas seleções, com escurecimento enzimático também reduzido.

Para frutas, o escurecimento enzimático tardio gera um potencial na sua tecnologia de processamento e comercialização *in natura*, pois além de se tornarem

atrativas na indústria de minimamente processados, se destinadas ao processamento de sucos integrais ou fermentados, os insumos que, hoje, são fundamentais para retardar a oxidação de compostos podem ser reduzidos ou removidos. Assim, a agroindústria, em parceria com os avanços biotecnológicos, poderá ser potencializada economicamente em um futuro próximo.

REFERÊNCIAS

- ABPM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ. **Brazilian Apple Yearbook**, 2016. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br>>. Acesso em: 22 de janeiro de 2019.
- ADEGOKE, G.O.; VIJAY KUMAR, M.; GOPALA KRISHNA, A.G.; VARADARAJ, M.C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B.R. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n.4., p. 283-398, 1998.
- ALBERTI, A.; BRAGA, C. M. JASTER, H.; NOGUEIRA, A. Dissolved oxygen content in apple must: technological implications in cider processing. **Institute of Brewing & Distilling**, v. 120, p. 65–70, 2014.
- ALBERTI, A.; SANTOS, T. P.M.; ZIELINSKI, A. A. F.; SANTOS, C. M.E.; BRAGA, C. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A. Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 436-443, 2016.
- ALBERTI, A.; MAFRA, L.I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**. v. 149, p. 151-158, 2014.
- ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A.A.F.; COUTO, M.; JUDACEWSKI, P.; MAFRA, L.I.; NOGUEIRA, A. Distribution of phenolic compounds and antioxidant capacity in apples tissues during ripening. **Journal of Food Science and Technology**, v.54, p. 1511-1518, 2017.
- ALONGI, M.; VERARDO, G.; GORASSINI, A.; ANESE, M. Effect of pasteurization on in vitro α -glucosidase inhibitory activity of apple juice. **LWT- Food Science and Technology**, v.98, p.366–371, 2018.
- ALONSO-SALCES, R.M.; BARRANCO, A.; ABAD, B.; BERRUETA, L.A.; GALLO, B.; VICENTE, F. Polyphenolic profiles of Basque cider apple cultivars and their technological properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2938-2952, 2004.
- ALONSO-SALCES, R. M.; BARRANCO, A.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F.; HERRERO, C. Classification of apple fruits according to their maturity state by the pattern recognition analysis of their polyphenolic compositions. **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 113-123, 2005.
- ALVAREZ, L.V.H.; ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. Monitoring of the phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of apple beverages according to geographical origin and their type: A chemometric study. **LWT-Food Science and Technology**, v. 84, p. 385-393, 2017.

ANGELO, P.M., JORGE N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANTHON, G. E.; BARRETT, D. M. Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.4119–4125, 2002.

APAK, R.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; ÇELİK, S. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity assay). **Microchimica Acta**, v. 160, p. 413-419, 2008.

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

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

BAHUKHANDI, A.; DHYANI, P.; BHATT, I. D.; RAWAL, R. S. (2018). Variation in polyphenolics and antioxidant activity of traditional apple cultivars from West Himalaya, Uttarakhand. **Horticultural Plant Journal**, v. 4, n. 4, p. 151-157, 2018.

BAL, L. M.; KAR, A.; SANTOSH, S.; NAIK, S. N. Kinetics of colour change of bamboo shoot slices during microwave drying. **International Journal Food Science and Technology**, v.46, p. 827–83, 2011.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, n.1; p.191-203, 2006.

BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; LAGANÀ, G.; GINESTRA, G.; BISIGNANO, C. Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat. **Food chemistry**, v.160, p. 292-297, 2014.

BARREIRO, J.A., MILANO, M., SANDOVAL, A.J. Kinetics of colour change of double concentrated tomato paste during thermal treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 33, p.359–371, 1997.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 19, p.47-64, 1997.

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

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.

BEHLING, E.B; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L.M.G. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BLANPIED, G. D.; SILSBY, K. J. Predicting harvest date windows for apples. Ithaca, NY: Cornell Cooperative Extension Information Bulletin 221, 1992.

BRAND-WILLAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T.; WEIR, I. S.; NEILL, S. J. ABA-induced no generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. **The Plant Journal**, v. 45, p. 113-122, 2006.

BURDA, S; OLESZEK, W.; LEE, C.Y. Phenolic compounds and their changes in apple during maturation and cold storage. **Food Agriculture and Food Chemistry**, v. 38, p. 945-948, 1998.

CÁRDENAS-PÉREZ, S.; CHANONA-PÉREZ, J.; MÉNDEZ-MÉNDEZ, J. V.; CALDERÓN-DOMÍNGUEZ, G.; LÓPEZ-SANTIAGO, R.; PEREA-FLORES, M. J.; ARZATE-VÁZQUEZ, I. Evaluation of the ripening stages of apple (Golden Delicious) by means of computer vision system. **Biosystems engineering**, v. 159, p. 46-58, 2017.

CARVALHO, J.R. F; SILVA, K.M.; SIMÕES, D.R.S.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Elaboração de fermentado frisanter de maçã com características semelhantes à sidra francesa. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 97-144, 2010.

CEFOLA, M.; D' ANTUONO, I.; PACE, B.; CALABRESE, N.; CARÍTO, A.; LINSALATA, V.; CARDINALI, A. Biochemical relationships and browning index for assessing the storage suitability of artichoke genotypes. **Food research international**, v. 48, n. 2, p. 397-403, 2012

CEYMANN, M.; ARRIGONI, E.; SCHÄRER, H.; NISING, A. B.; HURRELL, R. F. Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, p. 128-135, 2012.

CHENG, G. W.; CRISOSTO, C.H. Browning potential, phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 120, n. 5, p. 835-838, 1995.

CHEYNIER V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, p.223S-229S, 2005.

CHITARRA, A. B.; PRADO, M. E. T. Utilização de atmosfera modificada e controlada em frutos e hortaliças. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. p. 13-15, 23-25, 40-42, 2002.

CHOW, Y.-N.; LOUARME, L.; BONAZZI, C.; NICOLAS, J.; BILLAUD, C. Apple polyphenoloxidase inactivation during heating in the presence of ascorbic acid and chlorogenic acid. **Food Chemistry**, v.129, n.3, p.761–767, 2011.

CIE, In CARTER, E.C.; POINTER, M.R.; OHNO, Y.; ROBERTSON, A.R.; SEVE, S.; SCHANDA, J.D.; WITT, K. **Colorimetry- technical report**, 2004.

CONSTANTINOVICI, M.; OANCEA, D.; ZAHARESCU, T. Gamma irradiation effect on the enzymatic activities of horseradish and apple peroxidases. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, p. 33–36, 2009.

COUTO, M. A.L.; GUIDOLIN CANNIATTI-BRAZACA, S. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, 2010.

CRESPI, V.; MORAND, C.; MONACH, C.; BESSON, C.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. **The American Journal of Physiology**, v. 277, p. 120- 126, 1999.

DAVAR, R.; DARVISHZADEH, R.; MAJD, A. Changes in antioxidant systems in sunflower partial resistant and susceptible lines as affected by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biologia**, v.68, p. 821-829, 2013.

DIAZ NAPAL, G.N.; DEFAGO, M.; VALLADARES, G.; PALACIOS, S. Response of *Epilachna paenulata* to two flavonoids, Pinocembrin and quercetin, in a comparative study. **Journal of Chemical Ecology**, v.36, 898–904, 2010.

DIXON, R.A.; STEELE, C.L. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. **Trends Plant Science**, v. 4, p. 394–400, 1999.

DOGAN, S.; DOGAN, M. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*). **Food Chemistry**, v. 88, p. 69-77, 2004.

DONG, Y.H.; KVARNHEDEN, A.; YAO, J.L.; SUTHERLAND, P.W.; ATKINSON, R.G.; MORRIS, B.A.; GARDNER, R.C. Identification of pollination-induced genes from the ovary of apple (*Malus domestica*). **Sex Plant Reproduction**, v.11, p.277-283, 1998.

ERCOLI, L., BARIZÃO, E.O.; BOEING, J.S.; KVITSCHAL, M.V.; VISENTAINER, J.V.; ALMEIDA, V. C. Evaluation of chemical characteristics and correlation analysis with pulp browning of advanced selections of apples grown in Brazil. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, n. 1, 2017.

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

ERTEKIN FILIZ, B.; SEYDIM, A. C. Kinetic changes of antioxidant parameters, ascorbic acid loss, and hydroxymethyl furfural formation during apple chips production. **Journal of Food Biochemistry**, p.e12676, 2018.

ETIENNE, A.; GÉNARD, M.; LOBIT, P.; MBEGUIÉ-A-MBÉGUIÉ, D.; BUGAUD, C. (2013). What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. **Journal of Experimental Botany**, v.64, n.6, p.1451-1469, 2013.

FAOSTAT, *Food Agriculture Organization of the United Nations; Statistical database*. <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Acessado em 15 de março de 2017.

FANG, T.; ZHEN, Q.; LIAO, L.; OWITI, A.; ZHAO, L.; KORBAN, S. S.; HAN, Y. Variation of ascorbic acid concentration in fruits of cultivated and wild apples. **Food Chemistry**, v.225, p. 132–137, 2017.

FDA- *Food and Drug Administration Code of Federal Regulation (CFR)*. Title 21. Chapter I. Subchapter B. Part 101. Section 101.30. Percentage juice declaration for foods purporting to be beverages that contain fruit or vegetable juice. Disponível em <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=101.30>>, acesso dia 14 de dezembro de 2018.

FELTON, G. W., DONATO, K., DEL VECCHIO, R. J.; DUFFEY, S. S. 1989. Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, v.15, p. 2667–2694, 1989.

FERNÁNDEZ-JALAO, I.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; DE ANCOS, B. Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity of apple “Golden Delicious” from different geographical origin. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 51, p.20-31, 2019.

FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J.P.; NOCK, J.F.; KUPFERMAN, E.M.; BROWN, S.K.; WATKINS, C.B. Peroxidase activity and superficial acaid development in apple fruit. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7182-7186.

FERRETTI, G.; TURCO, I; BACCHETTI, T. Apple as a source of dietary phytonutrients: bioavailability and evidence of protective effects against human cardiovascular disease. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 13, p. 1234, 2014.

FÉVRIER, H.; LE QUÉRÉ, J. M.; LE BAIL, G.; GUYOT, S. Polyphenol profile, PPO activity and pH variation in relation to colour changes in a series of red-fleshed apple juices. **LWT-Food Science and Technology**, v.85, p.353-362, 2017.

FURLAN, C.R.C.; DANTAS, A.C.M.; DERNARDI, F.; BECKER, W.F.; MONTOVANI, A.D.E.L.A.R. Resistência genética dos acessos do banco de germoplasma de macieira da EPAGRI à mancha foliar de glomerella (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 507-514, 2010.

GAWLIK-DZIKI, U.; SZYMANOWSKA, U.; BARANIAK, B. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. **Food chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1047-1053, 2007.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GIRARDI, C.L.; SANHUEZA, R.M.V.; BENBDER, R.J. Manejo pós-colheita e rastreabilidade na produção integrada de maçãs. **Circular técnica- EMBRAPA Uva e vinho**, 23p.; v. 31, 2002.

GOMES, R. P. **Fruticultura brasileira**. 13 ed. São Paulo: Nobel, 2007.

GONGAL, A.; KARKEE, M.; AMATYA, S. Apple fruit size estimation using a 3D machine vision system. **Information Processing in Agriculture**, v. 5, n. 4, p. 498-503, 2018.

GOUPY, P.; AMIOT, M. J.; RICHARD-FORGET, F.; DUPRAT, F., AUBERT, S.; NICOLAS, J. Enzymatic browning of model solutions and apple phenolic extracts by apple polyphenoloxidase. **Journal of Food Science**, v.60, n.3, p.497-501, 1995.

GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 801-805, 1992.

GUYOT, S.; MARNET, N.; SANONER, P.; DRILLEAU, J. F. Variability of the Polyphenolic Composition of Cider Apple (*Malus domestica*) Fruits and Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6240-6247, 2003.

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

HARBORNE, J.B. General procedures and measurement of total phenolics. **Methods in plant biochemistry: Plant phenolics**. Academic Press; p. 1-28, 1989.

HAREL, E.; MAYER, A. M.; SHAIN, Y. Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. **Physiologia Plantarum**, v. 17, p. 921-930, 1964.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p. 572–584, 2002.

HEMACHANDRAN, H.; ANANTHARAMAN, A.; MOHAN, S.; MOHAN, G.; KUMAR, D. T.; DEY, D.; RAMAMOORTHY, S. Unraveling the inhibition mechanism of cyanidin-3-sophoroside on polyphenol oxidase and its effect on enzymatic browning of apples. **Food chemistry**, v.227, p. 102-110, 2017.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; HIROYUKI, I.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidase. **Plant Cell Physiology**, v. 42, p. 462-468, 2001.

HRAZDINA, G.; BORZEL, A. J.; ROBINSON, W. B. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5- diglucosides. **American Journal Enology and Viticulture**. v. 21, n. 4, p. 201-204, 1970.

HRAZDINA, G.; WAGNER, G. J. Compartmentation of plant phenolic compounds: Sites of synthesis and accumulation. **Annual Proceeds of Phytochemical Society of Europe**, v. 25, p.133–199, 1985.

HU, Z.; SHEN, Y.; SHEN, F.; SU, X. Effects of feeding *Clostera anachoreta* on hydrogen peroxide accumulation and activities of peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase in *Populus simonii* x *P. pyramidalis* ‘Opera 8277’ leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 995-1002, 2009.

HUANG, Z.; HU, H.; SHEN, F.; WU, B.; WANG, X.; ZHANG, B.; ZHANG, X. Relatively high acidity is an important breeding objective for fresh juice-specific apple cultivars. **Scientia Horticulturae**, v.233, p. 29–37, 2018.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. In: IAL. **Normas Analíticas, Instituto Adolfo Lutz**, 2008.

JACKS, T.J., DAVIDONIS, G.H. Superoxide, hydrogen peroxide, and the respiratory burst of fungally infected plant cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.158, p. 77–79, 1996.

JANOVIRAZ-KLAPP, A., RICHARD, F., & NICOLAS, J. Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. **Phytochemistry**, v. 28, n.11, p. 2903-2907, 1989.

JANZANTTI, 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**, v. 23, n. 3, p. 523-528, 2003.

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

JIANG, Y. M.; ZAUBERMAN, G.; FUCHS, Y. Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. **Postharvest Biology and Technology**, v.10, p. 221-228, 1997.

JIMENEZ, M.; GARCÍA-CARMONA, F. The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenoloxidase. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1503-1509, 1996.

JING, G.; HUANG, H.; YANG, B.; LI, J.; ZHENG, X.; JIANG, Y. Effect of pyrogallol on the physiology and biochemistry of litchi fruit during storage. **Chemistry Central Journal**, v.7, p. 1–11, 2013.

JUNIOR, C.L.A.; DENARDI, F.; DANTAS, C.M.; NODAR, R.O. Número de anteras por flor, grãos de pólen por antera e capacidade germinativa do pólen de diferentes cultivares de macieiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1255-1260, 2010.

KNEE, M.; BARTLEY, I.M. Composition and metabolism of cell wall polysaccharides in ripening fruits. **Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables**, v.28, p. 133-148, 1981.

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

KENNEDY, D.O.; WIGHTMAN, E.L. Herbal extracts and phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. **Advances in Nutrition**, v. 2, p. 32–50, 2011.

KHAN, A. U., WILSON, T. Reactive oxygen species as cellular messengers. **Chemistry & Biology**, v. 2, p. 437-445, 1995.

KIEWNING, D.; WOLLSEIFEN, R.; SCHMITZ-EIBERGER, M. The impact of catechin and epicatechin, total phenols and PPO activity on the Mal d 1 content in apple fruit. **Food Chemistry**, v. 140, p. 99–104, 2013.

KUMAR, V. B. A., MOHAN, T. K. C., & MURUGAN, K. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). **Food Chemistry**, v. 110, p. 328–333, 2008.

LAURILA, E.; KERVINEN, R. Y.; AHVENAINEN, R. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. **Postharvest News and Information**, v. 9, n. 4, p. 53-66, 1998.

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

LE BOURVELLEC, C.; LE QUÉRE, J. M.; SANONER, P.; DRILLEAU, J. F.; GUYOT, S. Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by procyanidins and polyphenol oxidation products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.1, p.122-130, 2004.

LE DEUN, E.; VAN DER WERF, R.; LE BAIL, G.; LE QUERE, J. M.; GUYOT, S. HPLC-DAD-MS profiling of polyphenols responsible for the yellow-orange color in apple juices of different French cider apple varieties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.63, n.35, p.7675-7684, 2015.

LEE, L.; ARUL, A.; LENCKI, R.; CASTAIGNE, F. A review on modified atmosphere packaging and preservation of fresh fruits and vegetables: physiological basis and practical aspects. **Packaging Technology Science**, v. 8, p.315-331, 1995.

LEE, J.; CHAN, B. L. S.; MITCHELL, A. E. Identification/quantification of free and bound phenolic acids in peel and pulp of apples (*Malus domestica*) using high resolution mass spectrometry (HRMS). **Food chemistry**, v.215, p. 301-310, 2017.

LEE, K.W.; KIM, Y.J.; KIM, D.O.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Major Phenolics in Apple and Their Contribution to the Total Antioxidant Capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6516–6520, 2003.

LEE, J. Y.; PARK, H. J.; LEE, C. Y.; CHOI, W. Y. Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. **LWT - Food Science and Technology**, v.36, n.3, p.323-329, 2003.

LEE, B.; SEO, J. D.; RHEE, J.-K.; KIM, C. Y. Heated apple juice supplemented with onion has greatly improved nutritional quality and browning index. **Food Chemistry**, v.201, p. 315–319, 2016.

LERNER, H.R.; MAYER, A.M.; HAREL, E. Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase. **Phytochemistry**, v. 11, p. 2415-2421, 1972.

LI, Y.; SCHELLHORN, H. E. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. **The Journal of nutrition**, v. 137, n.10, p. 2171-2184, 2007.

LIAUDANSKAS, M.; VIŠKELIS, P.; KVIKLYS, D.; RAUDONIS, R.; JANULIS, V. A Comparative Study of Phenolic Content in Apple Fruits. **International Journal of Food Properties**, v.18, n.5, p.945–953, 2015.

LIN, W.Z.; NAVARATNAM, S.; YAO, S.D.; LIN, N.Y., Antioxidative properties of hydroxycinnamic acid derivatives and a phenylpropanoid glycoside. A pulse radiolysis study. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 53, p. 425–430, 1998.

LOONEY, N. E. Effect of gibberellins based plant bioregulators on fruit quality. In_____. The fruit physiology: growth and development. **Good Fruit Grower**, v.39, p. 1-165, 1996.

LOZANO-DE-GONZÁLEZ, P. G.; DRUDIS-BISCARRI, R.; IBARZ-RIBAS, A. Enzymatic browning in apple pulps. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 564-567, 1994.

LIU, L.; CAO, S.; XU, Y.; ZHANG, M.; XIAO, G.; DENG, Q.; XIE, B. Oxidation of (-) epicatechin is a precursor of litchi pericarp enzymatic browning. **Food Chemistry**, v.118, n.3, p.508-511, 2010.

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

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

MA, Y.; BAN, Q.; SHI, J.; DONG, T.; JIANG, C. Z.; WANG, Q. 1-Methylcyclopropene (1-MCP), storage time, and shelf life and temperature affect phenolic compounds and antioxidant activity of ‘Jonagold’ apple. **Postharvest Biology and Technology**, v.150, p.71-79, 2019.

- MARQUES, L.; FLEURIET, A.; MACHEIX, J. 1995. Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.33, p.193-200, 1995.
- MARSZALEK, K.; WOŹNIAK, L.; BARBA, F. J.; SKAPSKA, S.; LORENZO, J. M.; ZAMBON, A.; SPILIMBERGO, S. Enzymatic, physicochemical, nutritional and phytochemical profile changes of apple (Golden Delicious L.) juice under supercritical carbon dioxide and long-term cold storage. **Food Chemistry**, v.268, p.279–286, 2018.
- MATEOS, M.; KE, D.; CANTWELL, M.; KADER, A. Phenolic metabolism and ethanolic fermentation of intact and cut lettuce exposed to C2-enriched atmosphere. **Postharvest Biology and Technology**, v. 3, p. 225-233, 1993.
- MATHEIS, G. Enzymatic browning of foods. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung NLM**, p. 176-454, 1983.
- MACHEIX, J.J.; FLEURIET, A.; BILLET, J. **Fruit Phenolics**. CRC Press. Inc., Boca Raton, FL, 1990.
- MASKAN, M. Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 169-175, 2000.
- MATHEW, A.G.; PARPIA, H.A.B. Food browning as a polyphenol reaction. **Advances in Food Research**, v.19, p.75-145, 1971.
- MCGHIE, T. K.; HUNT, M.; BARNETT, L. E. Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.3065–3070, 2005.
- MDLULI, K. M. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra). **Food Chemistry**, v. 92, p. 311-323, 2005.
- MELO, A. A. M.; VILAS BOAS, E. V. B. Inibição do escurecimento enzimático de banana maçã minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 110-115, 2006.
- MERKEN, H.M; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, n.3, p. 577-599, 2000.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.
- MOREIRA AVB, MANCINI-FILHO J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista Nutrição**, v.17, n.4, p. 411-24, 2004.

MOURA, S.C.S.R.; BERBARI, S.A.; GERMER, S.P.M.; de ALMEIDA, M.E.M.; FEFIM, D.A. Determinação da vida-de-prateleira de maçã-passa por testes acelerados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 27, v. 1, p. 141-148, 2007.

NASCIMENTO, J.B.; BARRIGOSI, J.A.F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian academy**, v.1, n.01; p.236, 2014.

NICOLAS, J. J. RICHARD-FORGET, F.C.; GOUPY, P.M.; AMIOT, M.J.; AUBERT, S.Y. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 2, p. 109-157, 1994.

NOGUEIRA, A., WOSIACKI, G. Apple Cider Fermentation. Handbook of plant-based fermented food and beverage technology Boca Raton,USA: **CRC Press**; p. 209-236, 2012.

OKTAY, M.; KÜCAÇALISKAN, I.; SAKIROGLU, H. Polyphenoloxidase from Amasya apple. **Journal of Food Science**, v.60, n.3, p. 494-496,1995.

OLIVEIRA, D.M.; BASTOS, D.H.M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, J.; MATEUS, N.; FREITAS, V. Flavanols: Catechins and Proanthocyanidins. **Natural Products**, v. 3, p. 1755-1788, 2013.

OLSON, D. G. Irradiation of food. **Food Techonology**, v. 52, n. 1, p. 56-62, 1998.

OSUGA, D.; VAN DER SCHAAF, A.; WHITAKER, J. R. In: YADA, R. Y., JACKMAN, R. L., SMITH, J. L. (Ed.). **Protein structure – function relationships in foods**, NewYork: Champman and Hall, p. 62-88, 1994.

PARAVISINI, L.; PETERSON, D. G. Role of Reactive Carbonyl Species in non-enzymatic browning of apple juice during storage. **Food Chemistry**, v.245, p.1010–1017, 2018.

PERSIC, M.; MIKULIC-PETKOVSEK, M.; SLATNAR, A.; VERBIC, R. Chemical composition of apple fruit, juice and pomace and the correlation between phenolic content, enzymatic activity and browning. **LWT- Food Science and Technology**, v.82, p.23-31, 2017.

PETKOVSEK, M.M; STAMPAR, F.; VEBERIC, R. Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.). **Scientia Horticulturae**;=, v. 114, p. 37–44, 2007.

PODSĘDEK, A.; WILSKA-JESZKA, J.; ANDERS, B.; MARKOWSKI, J. Compositional characterisation of some apple varieties. **European Food Research and Technology**, v. 210, p. 268–272, 2000.

POLESEL, D. N.; SINHORINI, A. L. C.; PERONE, C. A. S. Caracterização cinética da enzima catecolase (Polifenol oxidase) em extratos brutos da polpa e da casca de berinjela (*Solanum melongena* L.). **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 28, n. 2, p. 175-180, 2010.

RAO, M. V.; WATKINS, C. B.; BROWN, S. K.; WEEDEN, N. F. Active oxygen species metabolism in 'White Angel' 'Rome Beauty' apple selections resistant and susceptible to superficial scald. **Journal of the American Society Horticultural Science**, v.123, p.299-304, 1998.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGENTTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABST radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REEVES, S. G.; MCDOWELL, I.; BEHN, K.; DENCH, J. Biochemical studies of cocoa bean o-difenol O₂ oxidoreductase (catechol oxidase). **Food Chemistry**, p. 210-219, 1988.

REIS, C. M. F.; VILAS BOAS, E. V. B.; BOARI, C. A.; PÍCCOLI, R. H. Qualidade e vida de prateleira de banana prata minimamente processada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 702-708, 2004.

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

RICHARDSON, T.; HYSLOP, D. B. Enzimas. **Química de los alimentos**, p. 501-503, 2000.

RIZZON, L. A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características Analíticas dos Sucos de Maçã Gala, Golden Delicious e Fuji; **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 750-756, 2005.

ROBINSON, D.S., ESKIN, N.A.M. Oxydative Enzymes in Foods. **Elsevier**, 1991.

ROCHA, A. M. C. N.; MORAIS, A. M. M. B. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from "Jonagored" apple. **Food Control**, v.12, n.2, p.85-90, 2001.

SÁNCHEZ-RANGEL, J. C.; BENAVIDES, J.; HEREDIA, J. B.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. **Analytical Methods**, v. 5, n.21, p.5990-5999, 2013.

SANDERSON, G. W. Changes in the level of polyphenoloxidase activity in tea flush on storage after plucking. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 15, p. 634-638, 1964.

SAN MARTIN, A.; DU, P.; DIKALOVA, A.; LASSEGUE, B.; ALEMAN, M.; GONGORA, M. C.; GRIENDLING, K. K. Reactive oxygen species-selective regulation of aortic inflammatory gene expression in Type 2 diabetes. **The American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v.292, n.5, p. H2073–2082, 2007.

SAPERS, G. M.; MILLER, R. L. Browning inhibition in fresh-cut pears. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 2, p. 342-346, 1998.

SEO, S-Y.; SHARMA, V. K.; SHARMA, N. Mushroom tyrosinase: recent prospects. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 2837-2853, 2003.

SERRANO-MARTÍNEZ, A., FORTEA, M.I., DEL AMOR, F.M., NÚÑEZ-DELICADO, E. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annum* L.) peroxidase. **Food Chemistry**, v.107, p. 193–199, 2008.

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

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

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, p.265–273, 2001

SHOJI, T.; MASUMOTO, S.; MORIICHI, N.; KOBORI, M.; KANDA, T.; SHINMOTO, H.; TSUSHIDA, T. Procyanidin Trimers to Pentamers Fractionated from Apple Inhibit Melanogenesis in B16 Mouse Melanoma Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6105-6111, 2005.

SCHULZE, C.; BANGERT, A., KOTTRA, G., GEILLINGER, K. E., SCHWANCK, B., VOLLERT, H., DANIEL, H. Inhibition of the intestinal sodium-coupled glucose transporter 1 (SGLT1) by extracts and polyphenols from apple reduces postprandial blood glucose levels in mice and humans. **Molecular nutrition & food research**, v.58, n. 9, p. 1795-1808, 2014.

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

SIDDIQ, M.; SINHA, N. K.; CASH, J. N. Characterization of polyphenol oxidase from Stanley plums. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 1177-1179, 1992.

SIGMA-ALDRICH. Phloretin- Analytical reference material. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/91897?lang=pt®ion=BR&cm_sp=Insite_-noResults_floretin_-noResults9-3> ; acessado dia 11 de julho de 2017.

SILVA, M.L. C; COSTA, R.S.; SANTANA. A.S.; KOBLITZ, M.G.B.; Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, M. V; ROSA, C.I.L.F.; VILAS BOAS, E.V.B. Conceitos e métodos de controle do escurecimento enzimático no processamento mínimo de frutas e hortaliças. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 83-96, 2009.

SIMPSON, B.K., MARSHALL, M.R. and OTWELL, W.S. Phenoloxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): Purification and some properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.35, p. 918-921, 1987.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n. 3, p.144-158, 1965.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, n.15, v. 1; p. 71-81, 2002.

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.

STANGER, M. C.; STEFFENS, C. A.; SOETHE, C.; MOREIRA, M. A.; DO AMARANTE, C. V. T.; BOTH, V.; BRACKMANN, A. Phenolic compounds content and antioxidant activity of ‘Galaxy’ apples stored in dynamic controlled atmosphere and ultralow oxygen conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v. 144, p. 70-76, 2018.

SUBRAMANIAN, N.; VENKATESH, P.; GANGULI, S.; SINKAR, V. P. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, n. 47, p. 2571-2578, 1999.

TAKEO, T. Tea leaf polyphenoloxidase. I. Solubilization and properties of the structurally bound polyphenoloxidase in tea leaves. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 29, p. 558, 1965.

TAKOS, A.M., JAFFE, F.W., JACOB, S.R., BOGS, J., ROBINSON, S.P., WALKER, A.R. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. **Plant Physiology**, v.142, p.1216–1232, 2006.

THONGSOOK, T., BARRETT, D.M. Purification and Partial Characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) peroxidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 3206–3214, 2005.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A; CLIFFORD, M.N. Review- Flavanones, Chalcones – Nature, Occurrence and Dietary Burden. **Journal of the Science of food and agriculture**, v. 80, p. 1073-1080, 2000.

TOIVONEN, P. M. A.; BRUMMELL, D. A. Review: biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 1-14, 2008.

TORALLES, R.P.; VENDRUSCOLO, J.L.; VENDRUSCOLO, C.T.; DEL PINO, F.A.B.; ANTUNES, P.L. Determinação das constantes cinéticas de degradação do ácido ascórbico em purê de pêssego: efeito da temperatura e concentração. **Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.18-23, 2008.

TSAO, R.; YANG, R.; YOUNG, J. C.; ZHU, H. Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6347-6353, 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, p. 4989-95, 2005.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos: TACO**. 4 ed. Campinas, 2011. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2019.

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 321-325, 2001.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, v. 15, p. 49-127, 1981.

VAN ACQUIRE, S. A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VARMING, C.; PETERSEN, M. A.; TOLDAM-ANDERSEN, T. B. Ascorbic acid contents in Danish apple cultivars and commercial apple juices. **LWT - Food Science and Technology**, v.54, n.2, p.597–599, 2013.

VENDRUSCOLO, F.; KOCH, F.; PITOL, L. O.; NINOW, W. J. L. Produção de proteína unicelular a partir do bagaço de maçã utilizando fermentação em estado sólido. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.1, n.1, p.53-57, 2007.

VENDRUSCOLO, J.; TREPTOW, R.D.O.; GONÇALVES, C.; ANTUNES, P. Rendimento na extração e determinação das características físicas, químicas e sensoriais de suco de maçã clarificado. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 6, n.2, 2012.

VIEIRA, F.G.K.; BORGES, G.S.C.; COPETTI, C.; AMBONI, R.D.M. C; DENARDI, F.; FETT, R. Physico-chemical and antioxidant properties of six apple cultivars (*Malus domestica* Borkh) grown in southern Brazil. **Scientia Horticulturae**, v.122, p.421–425, 2009.

VRHOVSEK, U.; MASUERO, D.; GASPEROTTI, M.; FRANCESCHI, P.; CAPUTI, L.; VIOLA, R.; MATTIVI, F. A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 36, p. 8831-8840, 2012.

WESCHE-EBELING, P.; MONTGOMERY, M. W. Strawberry polyphenoloxidase: Extraction and partial characterization. **Journal of Food Science**, v. 55, p. 1320-1324, 1990.

WILCOX, D.E.; PORRAS, A.G.; HWANG, Y.T.; LERCH, K.; WINKLER, M.E.; SOLOMON, E.I. Substrate analogue binding the coupled binuclear copper active site in tyrosine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, p. 4015-4027, 1985.

WILEY, R. C. **Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables**, London: Chapman & Hall, 357 p., 1994.

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

WÓJCIK, P.; FILIPCZAK, J.; WÓJCIK, M. Effects of prebloom sprays of tryptophan and zinc on calcium nutrition, yielding and fruit quality of 'Elstar' apple trees. **Scientia Horticulturae**, v. 246, p. 212-216, 2019.

WOSIACKI, G.; PHOLMAN, B.C.; NOGUEIRA, A. Características de cultivares de maçã: avaliação físico-química e sensorial de quinze cultivares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. n. 24, v. 3, p. 347-352, 2004.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; Suco de maçã; In: VENTURI FILHO, W.G.V; **Bebidas não Alcoólicas- ciência e tecnologia**. vol. 2- bebidas; capítulo 20; p.387-418; São Paulo: Editora Blucher; 2018.

WU, K. H.; HO, C. T.; CHEN, Z. F.; CHEN, L. C.; WHANG-PENG, J.; LIN, T. N.; HO, Y. S. The apple polyphenol phloretin inhibits breast cancer cell migration and proliferation via inhibition of signals by type 2 glucose transporter. **Journal of food and drug analysis**, v.26, n.1, 221-231, 2018

YE, M.; YUE, T.; YUAN, Y. Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 14, p. 2951-2957, 2014.

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical proprieties and function of plant polyphenol oxidase: A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, p. 361-422, 2003.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M.L.; MERCADO-SILVA, E.; GUTIÉRREZ-CORTEZ, E.; CORNEJO-VILLEGAS, M.A. QUINTANAR-GUERRERO, D. The effect of nano-coating with α -tocopherol and xanthan gum on shelf-life and browning index of fresh-cut "Red Delicious" apples. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, p. 188-196, 2014.

ZARDO, D. M.; DANTAS, A.P.; VANZ, R.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; Intensidade de pigmentação vermelha em maçãs e sua relação com os teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidativa; **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.29, v.1; p.148-154, 2009.

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

ZARDO, D. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian apples. **Food and Nutrition Sciences**, v. 6, n. 8, p. 727, 2015.

ZEMEL G. P.; SIMS, C. A.; MARSHALL, M. R.; BALABAN, M. Low pH inactivation of polyphenoloxidase in apple juice. **Journal of Food Science**, v. 55, p. 562-563, 1990.

ZHANG, Z. ; HUBER, D.J; QU, H.; YUN, Z. ; WANG, H.; HUANG, Z. ; HUANG, H.; JIANG, Y. Enzymatic browning and antioxidant activities in harvested litchi fruit as influenced by apple polyphenols. **Food Chemistry**, v. 171, p. 191–199, 2015.

ZHAO, S.; BOMSER, J.; JOSEPH, E. L.; DISILVESTRO, R. A. Intakes of apples or apple polyphenols decrease plasma values for oxidized low-density lipoprotein/b2-glycoprotein I complex. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 493–497, 2013.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 6. 4, n. 4, p. 555-559, 1999.

ZHOU, P.; SMITH, N.L; LEE, C.Y. Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 41, p. 532-536, 1993.

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

ZIELINSKI, A. A. F.; ZARDO, D. M.; ALBERTI, A.; BORTOLINI, D. G.; BENVENUTTI, L.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A. (2018). Effect of cryoconcentration process on phenolic compounds and antioxidant activity in apple juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**; doi:10.1002/jsfa.9486, 2018.