

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO

Renata Linhares Ferreira

**AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE SECAGEM E DE EXTRAÇÃO DE
COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM FARINHA DE RESÍDUOS DE FRUTAS E
HORTALIÇAS**

Rio de Janeiro

2015

Renata Linhares Ferreira

**AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE SECAGEM E DE EXTRAÇÃO DE
COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM FARINHA DE RESÍDUOS DE FRUTAS E
HORTALIÇAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira

Co-orientadora: Profa. Dra. Édira Castello Branco de Andrade Gonçalves

Rio de Janeiro

2015

Renata Linhares Ferreira

**AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE SECAGEM E DE EXTRAÇÃO DE
COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM FARINHA DE RESÍDUOS DE FRUTAS E
HORTALIÇAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Gabriela Belo Koblitz

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Profa. Dra. Juliana Furtado Dias

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Profa. Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira (orientadora)

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Dedico este trabalho aos meus pais, Mônica e Paulo, e ao meu noivo Rafael, por todo apoio, motivação, e principalmente amor e carinho dedicados a mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre iluminando meu caminho e me dando forças nos momentos difíceis.

A minha amada família pelo incentivo, paciência, motivação, e principalmente amor e carinho que foram fundamentais para que eu pudesse alçar mais esta etapa profissional.

Ao meu noivo Rafael, por todo amor, companheirismo, compreensão e paciência.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Mariana Larraz, pela paciência, amizade, ensinamentos, e por toda a atenção dedicada a mim durante todo o curso.

À Prof^a. Dr^a. Édira Andrade, por todo o apoio e atenção ao meu trabalho, e pelos ensinamentos proporcionados.

À Prof^a. Dr^a. Maria Gabriela Bello Koblitz pela atenção, ensinamentos e colaboração.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN) da UNIRIO, pelas aulas ministradas e pelo suporte quando necessário.

Aos técnicos Cristiane, Henrique e Janaina pela atenção, colaboração, e atenção dedicadas a mim.

Aos membros da banca, Prof^a. Dr^a. Maria Gabriela Bello Koblitz e Prof^a. Dr^a. Juliana Furtado Dias, pelo aceite na participação da mesma.

Aos amigos do mestrado por toda a ajuda, companheirismo, motivação, e pelos momentos alegres de descontração.

Aos amigos do laboratório (Cristiane, Mônica e Joel) e da UNIRIO.

A FAPERJ pelo apoio financeiro no início do curso.

Resumo

A adição de compostos bioativos de origem natural tem sido uma estratégia da indústria para conferir maior funcionalidade aos alimentos. Resíduos de frutas e hortaliças representam uma fonte sustentável destes compostos antioxidantes, possibilitando aplicações eficientes como ingredientes funcionais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de diferentes condições de extração de compostos antioxidantes em farinha de frutas e hortaliças (FFH) obtida por diferentes processos de secagem. O resíduo do processamento integral de frutas e hortaliças foi transformado em farinha após secagem por liofilização (LIO) ou em estufa ventilada (SEE). As FFH foram trituradas, tamisadas e caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e colorimetria. Para o estudo das condições de extração de compostos antioxidantes (DPPH, Fenólicos Totais, FRAP, Flavonoides), aplicou-se planejamento fatorial reduzido, sendo as variáveis independentes: tempo de agitação (0,5; 12,25 e 24h), pH (3, 7,5 e 12) e proporção dos solventes (Acetona:H₂O e EtOH:H₂O), totalizando 12 ensaios para cada FFH (SEE e LIO). Foram analisados três lotes de cada FFH e os resultados expressos em base seca. Os dados foram analisados estatisticamente (ANOVA, Tukey, Bonferroni, $p < 0,05$ e regressão linear). As FFH não apresentaram diferenças nas propriedades colorimétricas. A FFH LIO apresentou matriz porosa e expandida com partículas de maior diâmetro médio (~850 μm), enquanto a SEE apresentou caráter granular, com regiões cristalinas e partículas de menor diâmetro médio (~300 μm). Em relação às condições de extração, todas as variáveis foram significativas. A mistura dos solventes Act:H₂O, EtOH:H₂O e EtOH:Act:H₂O apresentaram melhores rendimentos na extração dos compostos bioativos. Quando se aplicou pH alcalino, tempos mais curtos foram suficientes, enquanto que pH ácido promoveu bons resultados mas necessitou de maiores tempos de extração. Ambas as FFH apresentaram elevada atividade antioxidante. A FFH LIO demonstrou maior correlação positiva entre os métodos analisados e menor impacto microestrutural. No entanto a FFH SEE, por ser mais acessível e menos dispendiosa, pode ser utilizada como método preferencial de secagem de resíduos de frutas e hortaliças, por apresentar elevada capacidade antioxidante e uma maior disponibilização de compostos para extração.

Palavras-chave: capacidade antioxidante, compostos bioativos, frutas e hortaliças, microscopia, resíduos, secagem.

Abstract

The addition of bioactive compounds of natural origin has been a strategy of industry to provide greater functionality to the foodstuff. Fruit and vegetable residues represent a sustainable source of these antioxidant compounds, enabling efficient applications as functional ingredients. The aim of this study was to evaluate the impact of different extraction conditions of antioxidant compounds in fruit and vegetable residue flour (FFH) obtained by different drying processes. The residue of the full processing of fruits and vegetables was transformed into flour after freeze-drying (LIO) or air drying oven (SEE). The FFH were ground, sieved and characterized by scanning electron microscopy (SEM) and colorimeter. For the study of the extraction conditions of antioxidant compounds (DPPH, FRAP, total phenolics, Flavonoids), a reduced factorial design was applied with independent variables: stirring time (0.5; 12.25 and 24h), pH (3, 7.5 and 12) and solvents proportion (Acetone:H₂O and EtOH: H₂O), resulting 12 tests for each FFH (SEE and LIO). Three batches of each FFH was analyzed and the results expressed in dry basis. The data were statistically analyzed (ANOVA, Tukey, Bonferroni, $p < 0.05$ and linear regression). The FFH showed no differences in colorimetric properties. The FFH LIO presented a porous and expanded matrix with larger particles (~850 μm), while FFH SEE showed a granular character, with crystalline regions and smaller particles (~300 μm). Concerning the extraction conditions, all variables were significant. The mixture of solvents Act:H₂O, EtOH:H₂O and EtOH:Act:H₂O presented the best yield extraction of bioactive compounds. When applied alkaline pH, short times were enough, while acidic pH promoted good results but needed prolonged time of extraction. Both FFH presented high antioxidant activity. The FFH LIO demonstrated higher positive correlation between the methods analyzed and minor microstructural impact. However, FFH SEE is more accessible and less expensive, and thus can be used as a preferred method for drying fruits and vegetables, since presented high antioxidant capacity and a more readily availability of compounds for the extraction.

Keywords: antioxidant capacity, bioactive compounds, drying, fruit and vegetable, microscopy, residues.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Estruturas gerais das maiores classes de flavonoides	21
Figura 2. Distribuição de moléculas de carotenoides na membrana fosfo-lipídica celular.....	24
Figura 3. Estrutura molecular de alguns dos principais carotenoides	25
Figura 4. Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante	38
Figura 5. Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente de Folin & Ciocauteu's	39
Figura 6. Redução do Fe^{3+} e formação do complexo TPTZ	40
Figura 7. Complexação dos flavonoides com Cloreto de alumínio ($AlCl_3$)	41
Figura 8. Coordenadas de cromaticidade	44
Figura 9. Avaliação da capacidade antioxidante de FFH SEE e LIO (EC_{50})	53
Figura 10. Avaliação do teor de Fenólicos Totais em FFH SEE e LIO	54
Figura 11. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das FFH LIO e SEE	55
Figura 12. Fotomicrografias de FFH LIO e SEE pós extração com ensaio EtOH:Act, pH 3,0, 0,5h	58
Figura 13. Fotomicrografias de FFH LIO e SEE pós extração com ensaio EtOH:H ₂ O, pH 12,0, 0,5h	58
Figura 14. Fotomicrografias de FFH LIO e SEE pós extração com ensaio H ₂ O, pH 3,0, 0,5h	59
Figura 15. Fotomicrografias de FFH LIO e SEE pós extração com ensaio H ₂ O:Act, pH 12,0, 0,5h	59
Figura 16. Fotomicrografias de FFH LIO e SEE pós extração com ensaio EtOH:Act, pH 12,0, 24,0 h	60
Figura 17. Fotomicrografias de FFH LIO e SEE pós extração com ensaio EtOH:H ₂ O, pH 3, 24h	60
Figura 18. Fotomicrografias de FFH LIO e SEE pós extração com ensaio H ₂ O, pH 12,24h	61
Figura 19. Fotomicrografias de FFH LIO e SEE pós extração com ensaio H ₂ O:Act,	

pH 3, 24h	61
Figura 20. Fotomicrografias de FFH LIO e SEE pós extração com ensaio EtOH:Act:H ₂ O, pH 7,5, 12,25h	62
Figura 21. Diagrama de Pareto: avaliação dos efeitos das variáveis independentes investigadas na atividade antioxidante em FFH SEE e LIO	67
Figura 22. Diagrama de Pareto: avaliação dos efeitos das variáveis independentes investigadas na atividade antioxidante total pelo método de FRAP em FFH SEE e LIO	68
Figura 23. Diagrama de Pareto: avaliação dos efeitos das variáveis independentes no rendimento da extração de compostos fenólicos em FFH SEE e LIO	69
Figura 24. Diagrama de Pareto: avaliação dos efeitos das variáveis independentes no rendimento da extração de flavonoides em FFH SEE e LIO	70
Figura 25. Atividade antioxidante total pelo método de redução do radical DPPH	74
Figura 26. Teor de Fenólicos Totais nos extratos das FFH SEE e LIO	76
Figura 27. Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP)	79
Figura 28. Teor de flavonoides nos extratos de FFH SEE e LIO	81
Figura 29. Teor de ácido ascórbico nos extratos de FFH SEE e LIO	82
Figura 30. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre teor de fenólicos totais e teor ácido ascórbico em FFH SEE e FFH LIO	85
Figura 31. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre teor de fenólicos totais e teor de flavonoides em FFH SEE e FFH LIO	85
Figura 32. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em FFH SEE e FFH LIO	86
Figura 33. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em FFH SEE e FFH LIO	87
Figura 34. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre atividade antioxidante e teor de ácido ascórbico em FFH SEE e FFH LIO	88
Figura 35. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em FFH SEE (A) e FFH LIO (B)	88

Figura 36. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre atividade antioxidante e teor de flavonoides em FFH SEE (A) e FFH LIO (B) 89

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais classes de compostos fenólicos presentes em frutas e hortaliças	20
Tabela 2. Compostos fenólicos identificados em resíduos de frutas e hortaliças	29
Tabela 3. Conteúdo fenólico total de resíduos de frutas e hortaliças	31
Tabela 4. Ensaios do planejamento fatorial reduzido	48
Tabela 5. Concentração de extrato capaz de reduzir 50 % do DPPH (EC ₅₀)	53
Tabela 6. Análise colorimétrica das FFH SEE e LIO	65
Tabela 7. Análise colorimétrica dos extratos de FFH SEE e LIO	66
Tabela 8. Atividade antioxidante pelo método de redução do radical (DPPH)	74
Tabela 9. Teor de Fenólicos Totais nos extratos das FFH SEE e LIO	77
Tabela 10. Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP)	79
Tabela 11. Teor de flavonoides nos extratos de FFH SEE e LIO	82
Tabela 12. Teor de ácido ascórbico nos ensaios de FHH SEE e LIO	84

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVOS GERAIS	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1. COMPOSTOS BIOATIVOS DE FRUTAS E HORTALIÇAS	17
3.1.2. Compostos fenólicos	21
3.1.3. Ácido ascórbico	22
3.1.4. Carotenoides	23
3.1.5. Compostos bioativos em resíduos de frutas e hortaliças	26
3.2. EFEITO DO PROCESSAMENTO APLICADOS AOS RESÍDUOS DE FRUTAS E HORTALIÇAS	31
3.3. PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS APLICADOS A RESÍDUOS DE FRUTAS E HORTALIÇAS	35
3.4. PRINCIPAIS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	37
3.4.1. Teste de eliminação do radical 2,2-difenil-1- picrilidrazil (DPPH)	38
3.4.2. Fenólicos Totais	39
3.4.3. Capacidade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP)	40
3.4.4. Flavonoides	41
3.4.5. Determinação do ácido ascórbico	41
4. METODOLOGIA	42
4.1. RESÍDUOS DE FRUTAS E HORTALIÇAS	42
4.1.1. Amostras vegetais utilizadas	42
4.1.2. Obtenção da farinha de frutas hortaliças (FFH)	42
4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FFH E DOS EXTRATOS	43
4.1.1. Análise estrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	43
4.1.2. Análise colorimétrica	44

4.3. ESTUDO PRELIMINAR DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE AGITAÇÃO	44
4.3.1. Obtenção dos extratos por diferentes métodos de agitação	44
4.3.2. Determinação da capacidade de eliminação do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	45
4.3.3. Obtenção dos extratos a partir do método de agitação selecionado	46
4.3.4. Determinação da capacidade de eliminação do radical DPPH	46
4.3.5. Determinação de compostos fenólicos totais	46
4.4. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	47
4.4.1. PLANEJAMENTO FATORIAL REDUZIDO	47
4.4.2. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	48
4.4.3. Determinação de compostos fenólicos totais	48
4.4.4. Determinação do teor de flavonoides	49
4.4.5. Determinação do teor de ácido ascórbico	49
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE POR DIFERENTES MÉTODOS DE AGITAÇÃO	50
5.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FFH	55
5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura	55
5.2.2. Análise colorimétrica	64
5.3. Avaliação das condições de extração de compostos antioxidantes	65
5.3.1. Determinação das condições de extração	66
5.3.2. AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	72
5.3.3.6. <i>Correlação entre as variáveis dependentes</i>	84
6. Conclusão	90
7. Referências bibliográficas	91
8. Anexos	108

1. INTRODUÇÃO

A indústria de processamento de frutas e hortaliças produz ao longo de sua cadeia produtiva uma grande quantidade de subprodutos, que na maioria dos casos são descartados e considerados como custo operacional ou como fonte de contaminação, por não possuírem aplicação em novos processos (JUNIOR et al., 2005; SENA; NUNES, 2006; ABRAHÃO et al., 2010). De um modo geral, do total de frutas e hortaliças industrialmente processadas são gerados entre 30% a 40% de resíduos, e estes valores podem chegar à faixa de toneladas (SCHIEBER; STINTZING; CARLE, 2001).

Nota-se portanto, uma necessidade premente não só de impulsionar o uso integral das frutas e vegetais, minimizando assim os resíduos gerados, bem como de agregar valor a estes subprodutos possibilitando a criação de novas fontes de alimento (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003; AYALA-ZAVALA et al., 2010; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011; SUN-WATERHOUSE et al., 2011). Deste modo, é de extrema relevância a investigação científica e tecnológica que possibilite aplicações eficientes e seguras destes resíduos.

Os principais resíduos gerados no processamento de frutas e hortaliças são cascas, talos, bagaços, caroços e sementes. Apesar de frequentemente descartados, estes resíduos representam uma matéria-prima barata, sustentável e nutritiva. Nutricionalmente, esses resíduos têm chamado a atenção principalmente por serem considerados uma boa fonte de fibras alimentares e de compostos bioativos. Os principais compostos com potencial antioxidante presentes em resíduos de frutas e hortaliças são as vitaminas C e E, carotenoides e compostos fenólicos, em especial os flavonoides.

Diversos estudos recentes têm demonstrado que os compostos bioativos com potencial antioxidante, presentes em frutas e hortaliças se concentram majoritariamente nestas partes não comestíveis, consideradas como resíduos do processamento (COSTA et al., 2000; GORINSTEIN et al., 2001; DE ALMEIDA MELO et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2010; AYALA-ZAVALA et al., 2010).

Compostos fenólicos, como as antocianinas são preferencialmente encontrados na casca, enquanto as proantocianidinas, são também frequentemente encontradas nas sementes; já os ácidos clorogênicos e seus precursores, os ácidos

transcinnâmicos, também conhecidos como hidroxicinamatos são encontrados na polpa. Cascas de frutas cítricas, tais como limões, laranjas e toranjas apresentaram um conteúdo total de compostos fenólicos 15% superior aos das respectivas polpas, como também cascas de maçãs, pêsegos e peras apresentaram o dobro do total de compostos fenólicos quando comparadas as suas partes comestíveis (GORINSTEIN et al., 2001; 2002). Carotenoides são preferencialmente encontrados nos tecidos externos, na superfície dos frutos, como por exemplo, o licopeno encontrado majoritariamente na pele e pericarpo externo de tomates (AYALA-ZAVALA et al., 2010).

O consumo destes compostos bioativos é de grande importância para o organismo humano, por serem capazes de neutralizar os radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Estas espécies radicalares podem ser produzidas de maneira exacerbada devido a fatores endógenos como metabolismo celular e principalmente devido à exposição a fatores exógenos como poluição, tabagismo, alcoolismo, radiação e também através da alimentação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BARBOSA et al., 2010).

Sendo assim, os radicais livres podem ser formados pela existência de alguns processos patológicos como o envelhecimento, obesidade, inflamações, dentre outros. Quando acumulados no organismo, muitas vezes pela ineficiência do sistema de defesa endógeno, aliada à ausência de compostos antioxidantes, os radicais livres em excesso podem desencadear uma condição denominada estresse oxidativo. Essa condição tem sido relatada na literatura como um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como por exemplo, os mais diversos tipos de câncer (SMALL et al., 2012; TESTA et al., 2012; LAGOUGE; LARSSON, 2013; SERVIDDIO; BELLANTI; VENDEMIALE, 2013).

O consumo regular destas substâncias bioativas tem sido associado a efeitos benéficos à saúde do homem, no que diz respeito à prevenção das doenças crônicas, em especial doenças cardiovasculares (DCV) e alguns tipos de câncer, e retardo do processo de envelhecimento precoce (KIM, Y.-N.; GIRAUD; DRISKELL, 2007; PIENIZ et al., 2009; SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013; VAITHIYANATHAN; MIRUNALINI, 2013; KONTEK; JAKUBCZAK; MATLAWSKA-WASOWSKA, 2014).

Dentro desse contexto, visando minimizar o potencial depreciativo em sistemas biológicos dos radicais livres, compostos antioxidantes obtidos a partir de fontes naturais têm sido recentemente empregados para formulação de nutracêuticos, incorporados a produtos prontos com o objetivo de agregar valor funcional (SHARMA; ZHOU, 2011; BANERJEE et al., 2012). Além disso, estes antioxidantes naturais também têm sido utilizados com a proposta de aumentar a estabilidade dos alimentos frente à oxidação lipídica (ARMENTEROS et al., 2013; KIM, S.-J. et al., 2013), reduzindo perdas nutricionais e minimizando o uso de antioxidantes sintéticos (EL-SHOUBAGY; EL-ZAHAR, 2014).

A ação dos compostos antioxidantes acontece por meio de diferentes mecanismos, como por exemplo, a complexação de íons metálicos, captura de radicais livres, decomposição de peróxidos, inibição direta ou indireta de espécies reativas (EROs e ERNs), além da modulação de vias sinalizadoras celulares. A eficiência antioxidante de compostos bioativos em alimentos de origem vegetal depende de sua estrutura e da sua concentração no alimento (OLIVEIRA et al., 2009). Em termos experimentais, o processo de extração é uma etapa chave na obtenção de antioxidantes em rendimento aceitável.

No entanto, os processos de extração de compostos antioxidantes são altamente dependentes das características da matriz vegetal, que de um modo geral apresenta grande complexidade, da seletividade e do composto alvo de interesse para identificação e quantificação. Os maiores desafios devem-se à complexidade das matrizes alimentícias, o preparo da amostra e as técnicas de extração que serão aplicadas.

Deste modo, para o maior rendimento possível na extração de compostos antioxidantes em matrizes vegetais, é importante um estudo prévio de diferentes métodos de extração que contemplem diferentes extratores e condições diferenciadas de extração (pH, temperatura, agitação, pressão, dentre outros), afim de ajustá-los às particularidades das matrizes vegetais e dos compostos alvo de extração (BORGES, 2013; DELGADO et al., 2013; SANTANA et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de diferentes condições de extração e secagem no teor de compostos antioxidantes em farinha de frutas e hortaliças (FFH).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção de farinhas de frutas e hortaliças por diferentes métodos de secagem;
- Caracterização físico-química das farinhas de frutas e hortaliças por Microscopia Eletrônica de Varredura e Colorimetria;
- Avaliação de diferentes condições de extração de compostos bioativos nas farinhas de frutas e hortaliças;
- Determinação da capacidade antioxidante dos extratos obtidos por diferentes métodos de dosagem;
- Avaliação da preservação de compostos bioativos nos diferentes processos de secagem.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. COMPOSTOS BIOATIVOS DE FRUTAS E HORTALIÇAS

Frutas e hortaliças contêm diversos compostos antioxidantes, tais como ácido ascórbico, α -tocoferol, ácidos orgânicos, carotenoides e compostos fenólicos, principalmente flavonoides, que constituem o maior grupo de compostos fenólicos presentes em plantas, sendo responsáveis por mais da metade dos oito mil compostos fenólicos que ocorrem naturalmente (ISMAIL; MARJAN; FOONG, 2004; PATTHAMAKANOKPORN et al., 2008; VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008).

Globalmente, o destaque conferido aos compostos bioativos é devido a sua capacidade de absorver radicais livres e inibir a cadeia de iniciação ou ainda interromper a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais livres como os EROs e espécies reativas de hidrogênio (ERHs) (PODSEDEK, 2007). Deste modo, contribuem para a proteção contra os possíveis danos oxidativos

causados por estas espécies pró-oxidativas (MERKEN; BEECHER, 2000; MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; VAN BEEK, 2004; ŠKERGET et al., 2005). Na tabela 1 estão apresentadas algumas das principais classes de compostos fenólicos presentes em frutas e hortaliças.

Estudos epidemiológicos indicam que o consumo de frutas e hortaliças ricas em compostos antioxidantes, como os compostos fenólicos, podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, como também atuar na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis como arteriosclerose, artrite, inflamações, disfunção cerebral, alguns tipos de câncer e aceleração do processo de envelhecimento (FESKANICH et al., 2000; ARDESTANI; YAZDANPARAST, 2007; SOERJOMATARAM et al., 2010; HOFE et al., 2014). Além da ingestão de frutas e vegetais, acredita-se que a suplementação da dieta com extratos, contendo altas concentrações de compostos capazes de desativar radicais livres, tenha também efeitos benéficos (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005).

Devido ao seu potencial, extratos de vegetais ricos em compostos antioxidantes têm se tornado cada vez mais atrativos. No âmbito industrial, estes compostos têm sido testados como substituintes de antioxidantes sintéticos em alimentos, tais como o BHT, devido ao seu apelo natural e sua maior segurança (AYALA-ZAVALA et al., 2010; KANATT; CHANDER; SHARMA, 2010; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011). Extratos vegetais podem ser incorporados em produtos de consumo habitual como iogurtes, margarinas e biscoitos, elevando o seu teor nutricional, bem como aplicados como aditivos alimentares com a proposta de agirem como antimicrobianos, corantes, aromatizantes, agentes espessantes (POKORNÝ; YANISHLIEVA; GORDON, 2001; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; AYALA-ZAVALA et al., 2010; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011).

Estes extratos também têm sido utilizados na indústria farmacêutica, seja incorporados a diversos tipos de produtos cosméticos, como também encapsulados para a formulação de suplementos alimentares (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; PESCHEL et al., 2006). Os compostos antioxidantes em frutas e hortaliças, mais explorados na literatura para extração, quantificação e identificação são carotenoides, ácidos orgânicos com ênfase para o ácido ascórbico, e na grande maioria as classes de compostos fenólicos.

Tabela 1 – Principais classes de compostos fenólicos presentes em frutas e hortaliças.

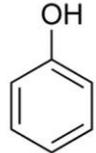
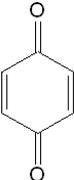
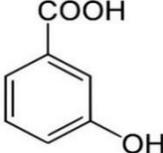
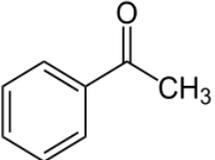
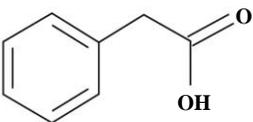
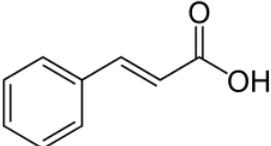
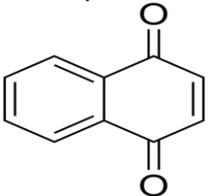
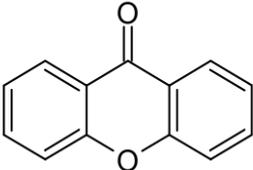
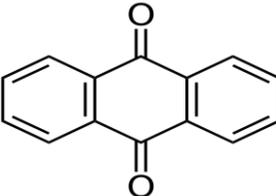
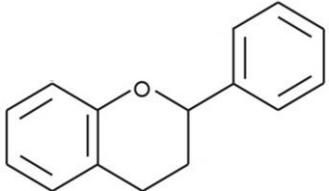
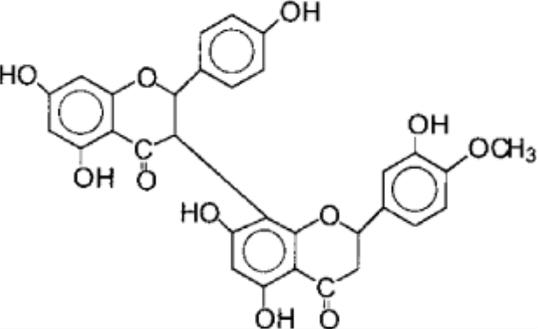
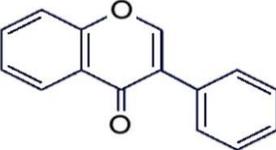
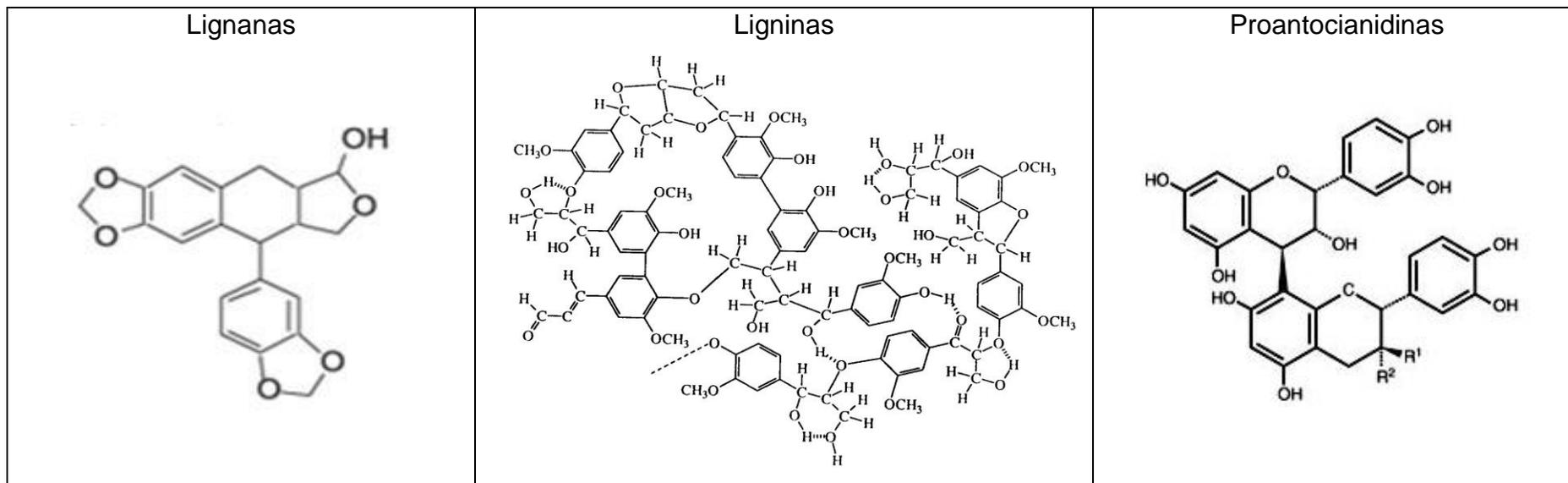
<p>Fenólico simples</p> 	<p>Benzoquinona</p> 	<p>Ácido hidroxibenzoico</p> 
<p>Acetofenona</p> 	<p>Ácidos fenilacéticos</p> 	<p>Ácidos hidroxicinâmicos (ácido cinâmico)</p> 
<p>Naftoquinonas</p> 	<p>Xantonas</p> 	<p>Antraquinonas</p> 
<p>Flavonoides</p> 	<p>Biflavonoides</p> 	<p>Isoflavonoides</p> 

Tabela 1 (Continuação) – Principais classes de compostos fenólicos presentes em frutas e hortaliças.



3.1.2. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários derivados do fosfato de pentose, e de vias fenilpropanóides em plantas (GORINSTEIN et al., 2002; RANDHIR; LIN; SHETTY, 2004), constituem os pigmentos vegetais além de estarem envolvidos no crescimento e reprodução das plantas, bem como na resistência das plantas às pragas e patógenos (ALASALVAR et al., 2001). Estruturalmente, os compostos fenólicos compreendem um anel benzênico apresentando um ou mais grupamentos hidroxila. Sua estrutura pode variar desde uma molécula fenólica monohidroxilada simples a um polímero complexo de peso molecular elevado (BRAVO, 1998).

Apesar desta diversidade estrutural, o grupo de compostos fenólicos vegetais são frequentemente referidos como "fenóis". Existem aproximadamente 8000 compostos naturais pertencentes à categoria de "fenóis" (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000) e englobam fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos, lignanas e ligninas.

Os "ácidos fenólicos", em geral, designam fenóis que possuem um grupamento funcional de ácido carboxílico que apresentam duas estruturas distintas, os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos. Dentre a classe dos polifenólicos, destacam-se os flavonoides (STALIKAS, 2007), que possuem uma estrutura química C6-C3-C6, que serve como base para a formação de mais da metade, dos oito mil diferentes compostos fenólicos. A estrutura geral de uma molécula de flavonoide é mostrada na Tabela 1. Variações no padrão de substituição do anel C resultam na formação das principais classes de flavonoides como é mostrado na figura 1.

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura, em particular do número e das posições dos grupos hidroxilas e da natureza das substituições nos anéis aromáticos. Compostos fenólicos que ocorrem naturalmente estão presentes majoritariamente como conjugados com outras moléculas, como por exemplo carboidratos que podem estar na forma de mono e polissacárideos, como também podem ocorrer como derivados funcionais, tais como ésteres metílicos (BAXTER; HARBORNE; MOSS, 1998), e estão presentes majoritariamente em frutas e hortaliças. Os compostos fenólicos exibem uma vasta gama de propriedades fisiológicas, tais como agentes anti-alérgicos, anti-arterogênicos, anti-inflamatórios, anti-microbianos, antioxidantes, anti-trombótico, cardioprotetor e efeitos

vasodilatadores (Benavente-Garcia et al., 1997, Manach, Mazur et al., 2005, Middleton et al., 2000).

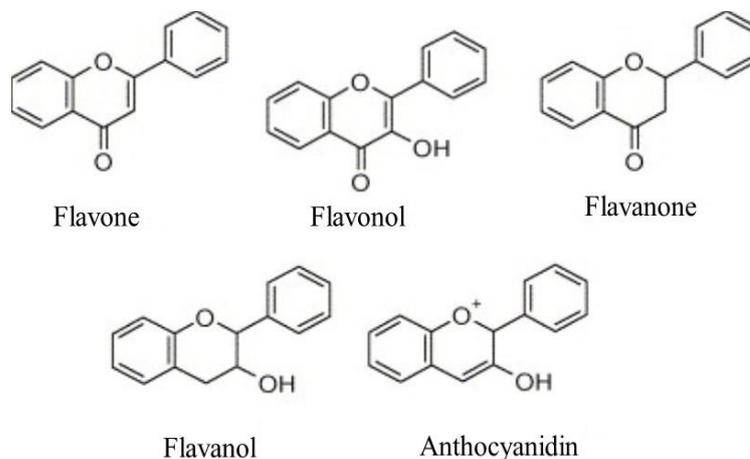


Figura 1. Estruturas gerais das maiores classes de flavonoides.

3.1.3. Ácido ascórbico

O ácido ascórbico, também denominado vitamina C ou ascorbato, é uma lactona ($C_6H_{12}O_6$) cujo peso molecular é de 176,13 Da. Foi isolado pela primeira vez em 1928, pelo bioquímico e Prêmio Nobel Szent-Gyorgyi. No seu estado natural, a vitamina C aparece na forma de cristal ou pó, e pode apresentar uma tonalidade desde o branco ao amarelo. O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel, com elevada instabilidade e facilmente oxidável podendo degradar-se prontamente.

A degradação do ácido ascórbico envolve primeiramente a oxidação a ácido dehidroascórbico, seguido por hidrólise para o ácido 2,3-dicetogulónico e desidratação e polimerização, e por fim a formação de uma grande variedade de produtos nutricionalmente inativos. A oxidação não catalisada é essencialmente insignificante, no entanto a oxidação catalizada por metais traço, é responsável por grande parte da perda de ácido ascorbico por oxidação em alimentos. Os subprodutos formados a partir da oxidação do ácido ascórbico, o radical ascorbila e o ácido dehidroascórbico são menos reativos, quando comparados aos radicais livres supracitados.

Tanto o ácido ascórbico quanto o dehidroascórbico têm a atividade de vitamina C. A perda desta atividade ocorre quando o ácido dehidroascórbico é hidrolisado com abertura do anel, formando ácido 2,3-dicetogulônico. Esta hidrólise é favorecida por

condições alcalinas. O ácido dehidroascórbico é mais estável em pH 2,5-5,5; e sua estabilidade diminui com o aumento de pH.

Uma das funções básicas e conhecidas do ácido ascórbico é a efetividade na doação elétrons, onde se destaca na aceleração de reações de hidroxilação (como na formação do colágeno), na regulação do sistema nervoso humano através da ação no metabolismo da tirosina, do ácido fólico e do triptofano. Em muitas destas reações, o ácido ascórbico fornece elétrons a enzimas que necessitam de íons metálicos prostéticos para atingirem atividade enzimática máxima.

Assim, o ácido ascórbico também tem um papel de elevada relevância no crescimento de tecidos e processos de cicatrização de feridas, na formação de neurotransmissores e no aumento da absorção de ferro ao nível dos intestinos, onde atua reduzindo os íons férricos (Fe^{3+}) a ferrosos (Fe^{2+}). Sua principal função é como antioxidante, agindo como sequestrante de espécies reativas de oxigênio como: hidroxil, peroxil, peroxinitrito, superóxido e oxigênio singlete, formando compostos menos reativos, e deste modo protegendo as células de danos ocasionados pelos radicais livres (BENDICH et al., 1986; CARR; FREI, 1999; KALT et al., 1999; PADAYATTY et al., 2004; WILSON, 2005).

O ácido ascórbico é majoritariamente encontrado em frutas, principalmente as pertencentes a família dos citrinos, tais como laranjas, limões, limas e tangerinas, sendo, todavia, também abundante nos vegetais verdes folhosos (KLEIN; PERRY, 1982; MILLER; RICE-EVANS, 1997; FAVELL, 1998; SZETO; TOMLINSON; BENZIE, 2002), e seu consumo tem sido associado a prevenção de um vasto número de doenças tais como diabetes, catarata, glaucoma, degeneração macular, arteriosclerose, derrame cerebral, doenças cardíacas e câncer (BLOCK, 1991; SNODDERLY, 1995; GOKCE et al., 1999; JACOB; SOTOUDEH, 2002; MULLAN et al., 2002).

3.1.4. Carotenoides

Carotenoides são pigmentos amarelos, laranjas e vermelhos, encontrados na natureza e estão presentes em plantas e micro-organismos. Em plantas estão localizados em organelas sub-celulares (cloroplastos e cromoplastos). De maneira geral em vegetais atuam como pigmentos foto-protetores na fotossíntese e como estabilizadores de membranas (SILVA, M. L. C. et al., 2010). Existem mais de 750

tipos diferentes de carotenoides na natureza, mas apenas 24 foram detectados em tecidos humanos (KHACHIK; BEECHER; SMITH, 1995), eles são classificados em grupos como carotenos, licopeno e xantofilas (ARMSTRONG; HEARST, 1996; BRITTON; LIAAEN-JENSEN; PFANDER, 2004).

Existe uma ampla variedade de carotenoides em tecidos de plantas comestíveis, onde temos como exemplos mais comuns o tomate (licopeno), cenoura (α e β -caroteno), batata doce (β -caroteno), milho (luteína e zeaxantina), pimentas vermelhas (capsantina) e urucum (bixina) (SILVA, M. L. C. et al., 2010). No entanto, o conteúdo de carotenoides nas frutas e vegetais irá depender de vários fatores como: variedade genética, estágio de maturação, armazenamento pós-colheita, processamento e preparo (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005). Os carotenoides são moléculas hidrofóbicas com baixa solubilidade em água, e seu melhor desempenho se dá em áreas da célula com caráter mais hidrofóbico, como ilustrado na figura 2.

A atividade antioxidante dos carotenoides está relacionada com a presença de inúmeras ligações duplas em sua estrutura, capazes de se ligar a elétrons desemparelhados. Sendo essa a principal característica que confere aos carotenoides a capacidade de reduzir e neutralizar as espécies reativas de oxigênio, com destaque para o oxigênio singlete (BRITTON, 1995; LEATHERMAN et al., 1999).

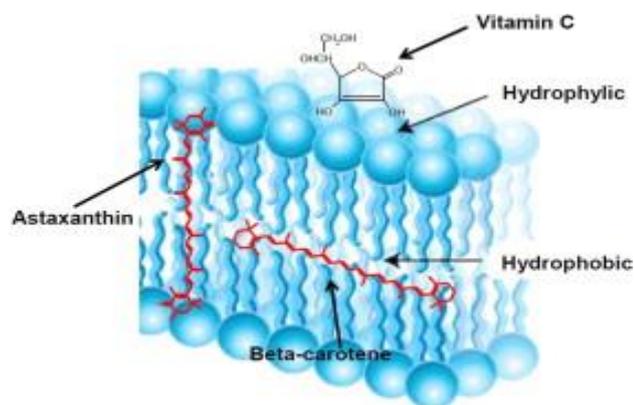


Figura 2 – Distribuição de moléculas de carotenoides na membrana fosfo-lipídica celular (JOMOVA; VALKO, 2013).

Os carotenoides podem existir em diferentes configurações, devido à isomeria em torno das ligações $C=C$ (BRITTON, 1995), as configurações em torno destas ligações duplas são denominados E ou Z, que geralmente correspondem a *trans* e *cis*, no entanto, existem algumas exceções. Alguns carotenoides também apresentam a

estrutura cíclica β -ionona em suas moléculas sendo, portanto, precursores de vitamina A onde, como exemplo, podemos citar os α , β e γ -caroteno e β -criptoxantina (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

As ligações duplas também tornam os carotenoides mais susceptíveis a processos oxidativos, que desencadeiam uma perda de coloração nos pigmentos presentes nos alimentos, porém esta facilidade de oxidação confere aos carotenoides um efeito positivo que possibilita a rápida redução e neutralização das espécies reativas de oxigênio. A figura 3 mostra a estrutura molecular de alguns dos principais carotenoides (MCNULTY et al., 2007).

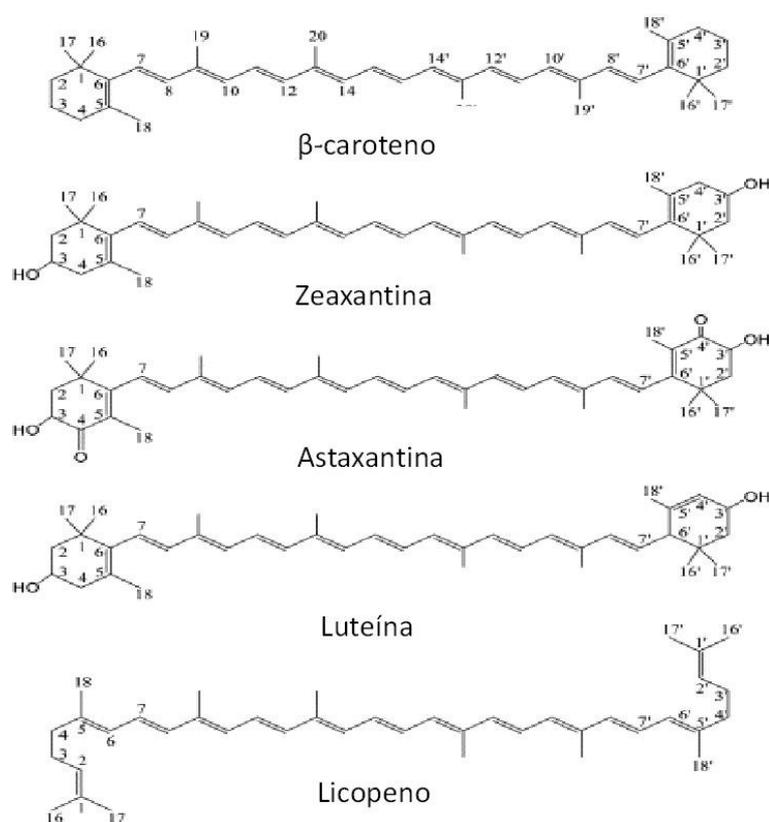


Figura 3 - Estrutura molecular de alguns dos principais carotenoides.

Os carotenoides, juntamente com as vitaminas, são as substâncias mais investigadas como agentes quimiopreventivos, funcionando como antioxidantes em sistemas biológicos (TANG, 2012; BOLHASSANI; KHAVARI; BATHAIE, 2014; GAREWAL; MEYSKENS JR, 2014). Frutas e vegetais são boas fontes de carotenoides, principalmente cenouras, abóboras (α e β -caroteno), tomates e produtos derivados, como extrato, polpa e molhos (licopeno), e espinafre (luteína)

(SCARMO et al., 2012; SILVA, N. A. D. et al., 2014). O licopeno aparece atualmente como um dos mais potentes antioxidantes, sendo sugerido na prevenção da carcinogênese e aterogênese por proteger moléculas como lipídios, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), proteínas e DNA (ELIASSEN et al., 2014). Estudos mostram a relação entre o aumento no consumo de alimentos ricos em carotenoides e a diminuição no risco de várias doenças (RICCIONI et al., 2012; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013; FIEDOR; BURDA, 2014). Segundo Rao & Rao (2007), os carotenoides sequestram o oxigênio singlete, removem os radicais peróxidos, modulam o metabolismo carcinogênico, inibem a proliferação celular, estimulam a comunicação entre células (junções *gap*) e elevam a resposta imune. Testes *in vitro* e *in vivo* sugerem que os carotenoides tem potencial atividade antioxidante, no sequestro e inativação de radicais livres (ERDMAN, 1999).

3.1.5. Compostos bioativos em resíduos de frutas e hortaliças

Frutas e hortaliças são ricas em compostos bioativos, os resíduos oriundos do processamento destes vegetais, que muitas das vezes são descartados, se mostram potenciais matérias-primas, uma vez que em muitos casos o conteúdo de compostos bioativos nos resíduos, é igual ou superior quando comparado ao das respectivas partes comestíveis. Estudo realizado por Gorinstein et al., (2001; 2002) demonstrou que cascas de limões, laranjas e toranjas demonstraram um conteúdo total de compostos fenólicos 15% superior aos das respectivas polpas. Cascas de maçãs, pêsegos e peras também apresentaram o dobro do total de compostos fenólicos quando comparadas as suas partes comestíveis.

Como estes resíduos são gerados em grande quantidade pela indústria de processamentos de frutos e vegetais, se tornam uma boa alternativa para a obtenção de extratos ricos em compostos bioativos, como exemplo desta afirmação temos estudo que analisou extratos de subprodutos de couve-flor, onde foram identificados flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos (ácido caféico e ácido sinápico), e concluíram que combinações de flavonóis como kaempferol e quercetina com ácido sinápico e glicose foram os principais compostos fenólicos presentes (LLORACH et al., 2003).

Subprodutos gerados do processamento de uvas para produção de suco de uva e vinho, que são em grande maioria cascas e sementes, também se mostraram fontes de diversos compostos fenólicos, principalmente mono, oligo e

proantocianidinas poliméricas (SHRIKHANDE, 2000; TORRES; BOBET, 2001). Em estudo semelhante, Pechel et al., (2006) avaliaram o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante de onze resíduos de frutas e vegetais derivados do processamento industrial, mostrou como resultados que os extratos com maior conteúdo fenólico foram em ordem crescente os extratos de maçã ($48,6 \pm 0,9$ mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato seco (mg EAG/g), pera ($60,7 \pm 0,9$ mg EAG/g), tomate ($61,0 \pm 3,0$ mg EAG/g) e alcachofra ($514,2 \pm 14,9$ mg EAG/g), concluindo que o teor de compostos fenólicos destes produtos e sua elevada capacidade antioxidante justifica aplicação de seus extratos para incorporação em produtos alimentícios e cosméticos.

Do mesmo modo, estudo envolvendo os subprodutos derivados de alface revelaram a ocorrência de ambos os ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides. O perfil de flavonoides de subprodutos de alface foi composto por flavonas (derivados de luteolina) e flavonóis (derivados de quercetina), enquanto os subprodutos de chicória eram compostos apenas de derivados kaempferol (LLORACH; TOMÁS-BARBERÁN; FERRERES, 2004).

Diante dos resultados apresentados pela literatura, podemos notar que compostos fenólicos, com ênfase para os flavonoides, destacam-se quantitativamente em resíduos de frutas e hortaliças. Isto pode ser devido a maior estabilidade destes compostos, frente às interferências causadas pelo processamento da matéria-prima bruta como, por exemplo, processo de lixiviação, oxidação pela exposição à luz, temperaturas elevadas e oxigênio atmosférico, que causam perdas de nutrientes, sendo as maiores perdas relacionadas aos compostos de caráter hidrossolúvel, como por exemplo, a vitamina C.

O conhecimento do teor de compostos fenólicos nos resíduos de frutas e hortaliças, tem incentivado estudos mais aprofundados objetivando um maior conhecimento destes compostos em termos qualitativos e quantitativos. Nas tabelas a seguir são mostrados alguns exemplos dos principais compostos fenólicos identificados (Tabela 2) e quantificados (Tabela 3) em subprodutos de frutas e hortaliças, através de métodos cromatográficos e espectrofotométricos.

Tabela 2. Compostos fenólicos identificados em resíduos de frutas e hortaliças.

Subprodutos	Compostos fenólicos	Quantidade	Referência
Cascas de maçã	Flavonoides	2299 mg/100 g	WOLFE; LIU (2003)
	Antocianinas	169 mg/100 g	
Casca de coco seco	Ácido ferúlico	13,0 mg/g	(DEY et al., 2003)
	4-hidroxibenzóico		
Casca de laranja amarga	Naringina	5,1 ± 0,4 mg/g	(SAWALHA et al., 2009)
	Neo-esperidina	7,9 ± 0,8 mg/g	
Casca de laranja doce	Narirutin	26,9 ± 2,1 mg/g	
	Hesperidina	35,2 ± 3,6 mg/g	
Casca de maçã estrela roxa	Acido ferúlico	2,37 ± 0,03 mg/g	
	Ácido gálico	229,49 ± 0,72 mg/g	
	Ácido elágico	121,8 ± 1,2 mg/g	
	Miricetina	9,88 ± 0,15 mg/g	
	Ácido cafeico	n/s*	
	Ácido sináptico	n/s*	
Casca de amarelo	Acido ferúlico	56,80 ± 0,27 mg/g	(MOO-HUCHIN et al., 2015)
	Ácido gálico	39,84 ± 0,21 mg/g	
	Ácido elágico	48,68 ± 0,45 mg/g	
	Miricetina	125,72 ± 0,38 mg/g	
	Ácido cafeico	2,18 ± 0,01 mg/g	
	Ácido sináptico	15,90 ± 0,13 mg/g	
Casca de caju vermelho	Acido ferúlico	107,28 ± 0,02 mg/g	
	Ácido gálico	33,64 ± 0,50 mg/g	
	Ácido elágico	95,64 ± 0,50 mg/g	
	Miricetina	29,51 ± 0,6 mg/g	
	Ácido cafeico	2,19 ± 0,01 mg/g	
	Ácido sináptico	3,69 ± 0,43 mg/g	

Tabela 2. Continuação

Fibra do bagaço de laranja	Ácido ferulico	60,4 ± 19,2 µg/g	
	Apigenina-6,8-di-C- glucosideo	506 ± 321 µg/g	
	Apigenina-7-O- rutenosideo ^c	45,4 ± 14,3 µg/g	
Fibra da casca de laranja	Ácido ferúlico	90,4 µg/g	
	Apigenina-6,8-di-C- glucosideo	738 µg/g	
Fibra do bagaço de tangerina	Ácido ferulico	30,2 µg/g	
	Apigenina-6,8-di-C- glucosideo	208 µg/g	
	Apigenina-7-O- rutenosideo ^c	47,3 µg/g	
Fibra da casca de tangerina	Ácido ferulico	158 µg/g	(DELPINO- RIUS et al., 2015)
	Apigenina-6,8-di-C- glucosideo	961 µg/g	
	Apigenina-7-O- rutenosideo	279 µg/g	
Fibra do bagaço de limão	Apigenina-6,8-di-C- glucosideo	44,4 ± 5.8 µg/ g	
	Apigenina-7-O- rutenosideo	121 ± 10 µg/ g	
	Luteolin-7-O- rutenoside	78,1 ± 8.6 µg/g	
	Diosmetin-8-C- glucoside	64,3 ± 2 µg/g	
	Diosmetin-6-C- glucoside	41,1 ± 5.6 µg/g	
Casca de batata	Ácido quinico	0,63 ± 0,03 mg/g	
	Ácido clorogênico	1,26 ± 0,06 mg/g	(WU et al., 2012)
	Ácido cafeico	0,72 ± 0,0026 mg/g	
	Metil-cafeato	0,033 ± 0,004 mg/g	

n/s* não foram encontrados valores significativos.

Tabela 3. Conteúdo fenólico total de resíduos de frutas e hortaliças.

Fruta	Resíduo	Conteúdo fenólico total	Referências	
Uva	Semente	43,9 ± 0,3 ^a		
Maçã verde	Bagaço	34,5 ± 0,1 ^a		
Maçã	Bagaço	11,6 ± 0,1 ^a	(KABIR et al., 2015)	
Pera verde	Bagaço	34,5 ± 0,3 ^a		
Brócolis	Talo	10,7 ± 0,1 ^a		
Alface	Talo	18,8 ± 0,2 ^a		
Maça estrela roxa	Casca	695,1 ± 47,3 ^b		(MOO-HUCHIN et al., 2015)
Caju amarelo	Casca	633,2 ± 22,2 ^b		
Caju vermelho	Casca	1316,8 ± 45,7 ^b		
Maça	Bagaço	836 ± 5 ^b	(WIJNGAARD; RÖBLE; BRUNTON, 2009)	
	Polpa	467 ± 5 ^b		
	Casca	1144 ± 14 ^b		
Kiwi	Casca	820 ± 25 ^b		
	Polpa	550 ± 17 ^b		
Toranja	Casca	2335 ± 97 ^b		
	Polpa	2095 ± 45 ^b		
Alface	Folhas externas	189 ± 13 ^b		
	Bagaço	257 ± 23 ^b		
Cherimoya Funchal	Casca	18,5 ± 0,10 ^b		(ALBUQUERQUE et al., 2014)
	Sementes	3,61 ± 0,02 ^b		
	Polpa	3,06 ± 0,03 ^b		
Cherimoya Mateus	Casca	19,6 ± 0,15 ^b		
	Sementes	4,16 ± 0,02 ^b		
	Polpa	4,31 ± 0,02 ^b		
Cherimoya Madeira	Casca	19,5 ± 0,13 ^b		
	Sementes	3,61 ± 0,02 ^b		
	Polpa	12,0 ± 0,04 ^b		
Cherimoya Perry vidal	Casca	17,0 ± 0,12 ^b		
	Sementes	3,35 ± 0,01 ^b		
	Polpa	3,43 ± 0,03 ^b		
Amora preta	Bagaço	7,36 ± 0,18 ^c	(MACHADO et al., 2015)	
Jabuticaba	Cascas	18,7 ± 0,4 ^c	(SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012)	

^aValores expressos em mg de equivalente de ácido clorogênico hemidratado/g de amostra seca.

^bValores expressos em mg de equivalente de ácido gálico/100 g de amostra seca. ^cValores expressos em mg de equivalente de ácido gálico/g de amostra seca.

3.2. EFEITO DO PROCESSAMENTO APLICADOS AOS RESÍDUOS DE FRUTAS E HORTALIÇAS

Recentemente, métodos de secagem foram aplicados em vegetais e frutas para estudar mudanças no conteúdo químico e nutritivo. Compostos bioativos, como compostos fenólicos e carotenoides, são susceptíveis às reações oxidativas. Sabe-se que os carotenoides são extremamente sensíveis a estas reações devido ao alto grau de instauração de suas ligações (PÉNICAUD et al., 2011), embora compostos fenólicos também pareceu ser significativamente alterada pelos métodos de processamento, tais como a secagem (TEWOLDE-BERHAN et al., 2015).

Os processos de secagem são métodos frequentemente aplicados a resíduos vegetais com o objetivo de aumentar sua estabilidade, isto se deve à diminuição da atividade de água, que reduz a probabilidade de crescimento microbiano e atividade enzimática, que atuam no processo de degradação da matriz vegetal. Quando são aplicadas altas temperaturas, estes processos também possibilitam a desnaturação, e conseqüentemente a inativação destas enzimas, garantindo a integridade a longo prazo dos nutrientes e compostos bioativos presentes.

Deste modo, processos de secagem possibilitam futuras aplicações dos resíduos, não só por aumentarem a vida de prateleira, mas também pela possibilidade de transformações estruturais. Modificações estruturais de resíduos de frutas e hortaliças podem ser obtidos após desidratação e moagem ou maceração, para obtenção dos mais diversos tipos de farinhas (WOLFE; LIU, 2003; CAPARINO et al., 2012; DORTA; LOBO; GONZÁLEZ, 2012).

No entanto essas modificações estruturais, podem favorecer perdas de compostos antioxidantes nos resíduos. Em frutas e hortaliças *in natura*, a estrutura celular de alguns compostos antioxidantes, como compostos fenólicos, estão presentes em formas complexadas com proteínas, o que lhes conferem certa estabilidade (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000). Todavia, durante as várias etapas de secagem, a estrutura celular e os complexos formados podem ser quebrados, expondo os compostos bioativos a fatores adversos. A estabilidade destes compostos varia de acordo com a exposição a altas temperaturas, oxigênio atmosférico circulante através da ventilação, exposição à luz (raios UV), umidade relativa, acidez, presença de agentes catalisadores como metais e da própria

conformação estrutural da matriz vegetal (KIM, S.; PARK; HWANG, 2004; REGIER et al., 2005).

É notório que o processamento de alimentos reduz a qualidade de frutas e legumes. Neste sentido, para garantir a maior qualidade do produto final, é importante o emprego de técnicas adequadas de desidratação, levando em conta principalmente as características específicas de cada matriz e as classes de nutrientes que se deseja preservar. As formas mais comumente usadas para desidratação de resíduos de frutas e hortaliças são: a secagem convencional e a secagem por liofilização.

O processo de secagem convencional baseia-se na aplicação de corrente de ar seco em temperaturas médias a altas (entre 55 °C e 120 °C), propiciando a evaporação gradativa da água. O objetivo principal deste processo de desidratação é o aumento da estabilidade e da vida útil do produto, mas algumas vantagens como concentração de nutrientes, facilidade no armazenamento, transporte e conservação são também atribuídas à secagem. Por outro lado, a secagem convencional pode acarretar a perda de determinadas propriedades dos alimentos, afetando principalmente nutrientes lábeis como as vitaminas e pigmentos.

Dependendo da intensidade do tratamento térmico aplicado, a secagem por ar quente pode promover modificações nas características organolépticas e antioxidante das frutas e hortaliças, devido à volatilização de compostos aromáticos, como por exemplo ácidos orgânicos, oxidação de vitaminas e pela geração de derivados químicos com atividade antioxidante inferior, inalterada ou ainda superior, como por exemplo, produtos oriundos da reação de Maillard, que podem aumentar a atividade antioxidante (YILMAZ; TOLEDO, 2005).

Liofilização é um processo de desidratação por sublimação, isto é, a transformação direta da água em estado sólido em vapor d'água, sem passar pelo estado líquido, em condições de pressão e temperatura inferiores à do ponto triplo. Por trabalhar com baixas temperaturas e, geralmente sob condições de vácuo, a liofilização minimiza a probabilidade de perdas de nutrientes e modificações organolépticas, por isso é recomendada para materiais termo-sensíveis, como materiais biológicos, farmacêuticos, alimentos e produtos químicos, gerando produtos de qualidade superior quando comparados com outras técnicas de secagem (RATTI, 2001).

Atribui-se à liofilização características favoráveis à extração de compostos bioativos, tais como pequena densidade aparente, alta porosidade, retenção de aromas e excelente capacidade de reidratação (KROKIDA; KARATHANOS; MAROULIS, 1998). Contudo, a liofilização provoca mudanças estruturais, principalmente nos açúcares, como o alto grau de amorfismo, tornando o produto altamente higroscópico e sensível às mudanças físico-químicas que podem prejudicar a vida de prateleira e estabilidade do produto (DE OLIVEIRA ALVES et al., 2008). Além disso, durante o congelamento, que compreende a primeira etapa do processo, grandes cristais de gelo podem ser formados e romper a estrutura celular, colocando em contato enzimas e substratos, antes compartimentalizados e permitindo reações enzimáticas que podem modificar o sabor, a cor, o aroma e a textura dos alimentos (VICENTE et al., 2005).

De um modo comparativo quanto aos efeitos destes processos de secagem na preservação do teor de compostos antioxidantes, Larrauri, Rupérez, e Saura-Calixto (1997) avaliaram o efeito de processos de secagem por circulação de ar quente (60°C, 100°C e 140°C) e liofilização no teor de polifenóis totais extraíveis, taninos condensados e atividade antioxidante total de cascas de uva vermelha. Os autores mostraram que as amostras secas convencionalmente a 60°C não diferiram significativamente das amostras liofilizadas. No entanto, a aplicação de temperaturas elevadas de 100°C e 140°C, reduziram significativamente em ambos os casos, os teores de polifenóis totais extraíveis (18,6 e 32,6%), taninos condensados (11,1 e 16,6%), bem como a atividade antioxidante (28 e 50%) das amostras.

Os mesmos autores avaliaram as propriedades colorimétricas das amostras e mostraram que as amostras secas a 60°C não diferiram significativamente das liofilizadas. Enquanto que a 140°C as amostras secas apresentaram diferença de cor total e perda de cor vermelha significativamente maiores, alterações relacionadas com a degradação de antocianinas. Os autores concluíram que compostos antioxidantes em cascas de uva vermelha, enfatizando taninos condensados, podem ser bastante estáveis ao calor, e que para preservação das propriedades funcionais devem ser aplicadas temperaturas de até 60°C.

Do mesmo modo, a atividade de eliminação de radicais livres e os níveis de compostos fenólicos em folhas de amoreira, não demonstraram diferença nos processos de secagem por ar quente com emprego de temperaturas de 60°C ou

inferiores, quando comparados ao processo por liofilização. No entanto, quando aplicadas temperaturas acima de 70 °C, a capacidade antioxidante diminuiu drasticamente (KATSUBE et al., 2009).

Em análise de retenção de compostos voláteis aromáticos de maçãs (acetato de etila, butirato de etila e antranilato de metila), utilizando-se parâmetros cinéticos para avaliar a perda gradativa destes compostos voláteis no processo de secagem por ar quente a 30°C, 50°C e 70°C. Os autores observaram que a maior perda de compostos voláteis ocorreu nas primeiras etapas em todas as temperaturas testadas e a perda de compostos voláteis foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura. Os autores evidenciaram que métodos de secagem com baixas temperaturas e liofilização são sugeridos para a máxima retenção de aromas em produtos secos (KROKIDA; PHILIPPOPOULOS, 2006).

Corroborando os resultados dos estudos anteriores, Dorta, Lobo e González (2012), observaram que a aplicação de temperaturas de secagem acima de 60-70°C, prejudicou a preservação da capacidade antioxidante de cascas e caroços de manga, nos testes de capacidade de eliminação de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica. Os autores observaram que o processo de liofilização possibilitou que caroços e cascas de manga mantivessem a mesma capacidade antioxidante quando comparadas a seu estado *in natura*.

De maneira geral, segundo resultados apresentados pela literatura, os processos de secagem por circulação de ar quente com temperaturas superiores a 60 °C podem reduzir o teor de compostos bioativos, devido à transformação química destes compostos em compostos similares com atividade antioxidante inferior ou pró-oxidante, e favorecer a oxidação dos compostos em resíduos de frutas e hortaliças, quando comparados ao processo de liofilização. Alguns estudos apontaram ainda que o processo de secagem por ar quente mesmo com aplicação de temperaturas inferiores a 60 °C, mostrou-se menos eficiente que a liofilização na conservação de compostos antioxidantes em cascas de maçã. O processo de liofilização possibilitou maior conservação do conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas, sendo semelhantes ao das cascas de maçãs frescas (Wolfe e Liu (2003).

No entanto, levando-se em consideração i) que a liofilização é um processo dispendioso, em termos de custo energético do equipamento e de tempo, ii) bem como a potencial preservação de compostos antioxidantes em baixas temperaturas (<60

°C), iii) além das modificações estruturais induzidas por ambos os processos, que podem afetar a extractabilidade dos compostos antioxidantes; observa-se a necessidade de mais estudos envolvendo estes processos de secagem, não somente no que diz respeito a caracterizações relacionadas a capacidade antioxidante, como também relacionadas as modificações estruturais e favorecimento da extractabilidade dos compostos bioativos.

3.3. PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS APLICADOS A RESÍDUOS DE FRUTAS E HORTALIÇAS

O grande número de publicações sobre análise de compostos antioxidantes, ao longo das duas últimas décadas atesta a importância e atualidade do tema. No entanto, não há consenso acerca dos métodos analíticos a serem empregados, uma vez que estes se mostram altamente dependentes das características da matriz, da disponibilidade das técnicas, da seletividade e do interesse na identificação e quantificação destes compostos. Um dos maiores desafios deve-se à complexidade das matrizes alimentícias, o preparo da amostra e as técnicas de extração que serão aplicadas.

Uma alternativa viável para obtenção e conservação dos compostos bioativos presentes em resíduos de frutas e hortaliças seria submeter estes resíduos a processos de extração sólido-líquido por meio da utilização de solventes químicos. Antes do processo de extração os resíduos vegetais geralmente são congelados, desidratados através de métodos convencionais como secagem em estufa ventilada onde se utiliza temperaturas de brandas à elevadas ou liofilizados onde não há aplicação de calor, como também são moídos e peneirados. Estes processos de desidratação e maceração da matéria-prima vegetal permitem um aumento da superfície de contato com o solvente de extração e ocasionam a inativação de enzimas naturalmente presente em vegetais, como por exemplo lipoxigenase e polifenoloxidase. Estas enzimas são responsáveis pelo processo de rancidez oxidativa e escurecimento enzimático, que causam modificações físico-químicas na matéria-prima vegetal, podendo ocasionar não só a oxidação como também a inatividade de seus compostos bioativos (JUNTACHOTE; BERGHOFER, 2005).

De um modo geral, não existe um método de extração bem estabelecido, características e rendimento satisfatórios para o isolamento de todos ou de classe

específica de antioxidantes naturais, devido a diversos fatores, como por exemplo a natureza química e polaridade desses compostos que podem variar dos mais apolares, aos altamente polarizados (SHAHIDI, 1997).

Em frutas e vegetais pode ser encontrada uma vasta gama de compostos bioativos, com características distintas e em teores diferenciados. Na matriz vegetal, estes compostos geralmente estão interagindo com carboidratos, proteínas e outros componentes presentes. Alguns desses complexos formados, assim como alguns compostos fenólicos com alto peso molecular, são altamente insolúveis em água, no entanto, os extratos sempre contêm mistura de substâncias fenólicas de diferentes classes e polaridades que são solubilizadas no solvente do sistema escolhido (ANDREO; JORGE, 2006; GRUZ et al., 2013; SOUSA; TREVISAN; BASTOS, 2013).

Em grande parte de frutas e hortaliças, os pigmentos estão localizados nas células próximas à superfície, permitindo que atuem como filtros às radiações ultravioleta, melhorem e regulem a taxa de fotossíntese (MAZZA e MINIATI, 1993). Estes pigmentos são facilmente extraídos de materiais vegetais por solventes orgânicos. Tradicionalmente, soluções acidificadas de metanol, etanol, acetona, água e misturas de acetona/metanol/água têm sido usadas para a extração de antocianinas (JU e HOWARD, 2003).

Os solventes mais utilizados para a extração destes pigmentos e compostos bioativos de materiais vegetais são os solventes orgânicos metanol, etanol, acetona, água, e tradicionalmente estas soluções são acidificadas a 1% de ácido clorídrico (HCl) para facilitar a retirada destes compostos da matriz vegetal. São utilizados também outros solventes como acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações, cada um destes solventes é selecionado de acordo com a polaridade e solubilidade dos compostos selecionados como alvo principal de extração (SHAHIDI, 1997; DE SOUZA-SARTORI et al., 2012).

Além dos solventes empregados nos processos de extração de compostos bioativos e pigmentos de matrizes vegetais, os métodos utilizados também afetam significativamente o perfil químico dos extratos obtidos, em termos do número e das moléculas alvo de extração, a escolha do método de extração dependerá do objetivo da aplicação final do produto.

Dentre os métodos comumente utilizados para extração de compostos bioativos em resíduos de frutas e hortaliças, podemos citar o método de extração com

CO₂ supercrítico (PAES et al., 2014; VIGANÓ; DA FONSECA MACHADO; MARTÍNEZ, 2015), extração com aplicação de ultrassom (REÁTEGUI et al., 2014), processo de extração com redução controlada de pressão (REZZOUG; LOUKA, 2009; PAES et al., 2014), extração com H₂O subcrítica (MONRAD et al., 2014; DUBA et al., 2015), extração com fluido supercrítico (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014; VIGANÓ; DA FONSECA MACHADO; MARTÍNEZ, 2015) e extração assistida por micro-ondas (SAHRAOUI et al., 2011; BAIANO et al., 2014; HO et al., 2015), que podem ser aplicados separadamente ou conjuntamente, e como exemplo de uma associação muito adotada na literatura, podemos citar a utilização de extração com CO₂ supercrítico com a aplicação de ultra-som (VIGANÓ; DA FONSECA MACHADO; MARTÍNEZ, 2015).

Estes métodos de extração são considerados rápidos, eficientes e com alto rendimento de compostos biologicamente ativos, ou seja, que não sofreram processo de oxidação ocasionada pela exposição a fatores externos no decorrer do processo de extração, como por exemplo, exposição a luz, O₂, entre outros. No entanto até o momento, nenhum método foi estabelecido como padrão para extração de compostos bioativos em resíduos de frutas e hortaliças.

Considerando estes aspectos, para a seleção de um processo de extração adequado de compostos bioativos em matrizes vegetais, não é aconselhável generalizar os métodos e solventes que serão empregados, deve-se selecioná-los levando em consideração a especificidade de cada matriz e a natureza diversificada dos antioxidantes naturais.

3.4. PRINCIPAIS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A caracterização de resíduos de frutas e hortaliças através de processos de identificação e quantificação de seu conteúdo de compostos bioativos, é um passo importante para aprofundar o conhecimento sobre a natureza destes compostos, como também possibilitar o isolamento e possíveis aplicações práticas. Estas aplicações são possíveis em suplementos, alimentos, nutracêuticos, dentre outros, agregando atividade antioxidante a estes produtos, que podem atuar como auxiliares na prevenção de doenças (DASARI; WUDAYAGIRI; VALLURU, 2013).

Os primeiros e bem estabelecidos métodos utilizados são os de quantificação, e como principais exemplos, devido a sua simplicidade e baixo custo, estão os

colorimétricos e espectrofotométricos. Estes métodos são parte de metodologias que tem por objetivo determinar os diferentes grupos estruturais presentes em compostos antioxidantes, através de variações de cor, que possuem características espectrais próprias e são detectadas por equipamentos UV-vis.

Estes métodos são dependentes da aplicação prévia de metodologias como os métodos de Folin e Ciocauteu's (TSAO; YANG, 2003; LAPORNIK; PROŠEK; WONDRA, 2005), Proantocianidinas totais (NACZK; SHAHIDI, 2006), Antocianidinas totais baseado em diferencial de pH (LAPORNIK; PROŠEK; WONDRA, 2005), teor total de flavonoides baseado em método colorimétrico de complexação de compostos fenólicos com Al (III) (HUANG, W. et al., 2009), que são amplamente utilizados para determinação de compostos fenólicos, e redução do radical DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), voltada para determinação de compostos mais apolares como, por exemplo, carotenoides.

Estes métodos, com ênfase para os espectrofotométricos, fornecem informações qualitativas e quantitativas muito úteis, mas possuem a desvantagem de possibilitarem apenas uma estimativa do conteúdo de compostos antioxidantes totais, não separam nem quantificam individualmente.

3.4.1. Teste de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH)

O ensaio DPPH tornou-se bastante popular nos estudos de antioxidantes naturais, sendo uma das razões por se apresentar como um método simples e altamente sensível. Foi inicialmente descrito por Brand-Williams (1995) e baseia-se na teoria de que um doador de hidrogênio é um antioxidante. O princípio do ensaio baseia-se na redução do radical livre estável orgânico de nitrogênio (DPPH), que apresenta o máximo de absorção a 515-520 nm. Ao abstrair um radical hidrogênio do antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorbância e da coloração passando da cor violeta para o amarelo (Figura 4).

O ensaio do DPPH é um teste rápido, simples, preciso e com boa reprodutibilidade dos resultados, que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação. Entretanto, algumas precauções devem ser tomadas quanto a utilização do método e interpretação dos resultados, dentre eles, o tipo e concentração do compostos analisado, cinética de reação do antioxidante, características do meio reacional (pH, tipo de solvente), presença de interferentes, sinergismo, afinidade solvente:substrato, e apresentação dos resultados.

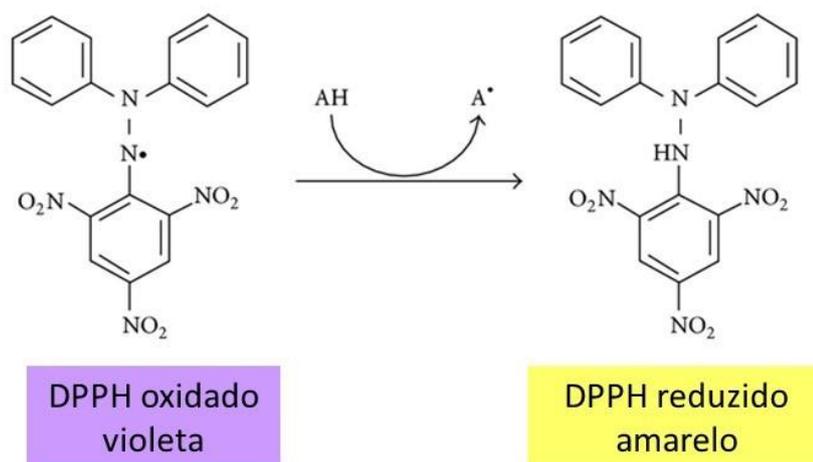


Figura 4. Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante.

3.4.2. Fenólicos Totais

A quantificação de compostos fenólicos totais (FT) é realizada por meio de uma variedade de métodos; todavia o ensaio de Folin-Ciocalteu é o procedimento de reação rápida mais amplamente usado para a quantificação de FT em plantas. O teste de FT consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstíco, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras que, não necessariamente, precisam ter natureza fenólica.

Os compostos fenólicos são geralmente determinados utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu; no entanto, ele interage com outras substâncias redutoras não fenólicas e, assim, sobrestima o teor de polifenóis (George et al., 2011), tais como o ácido ascórbico, que se comportam como agentes de redução. A [figura 5](#) mostra a desprotonação dos compostos fenólicos (no exemplo, o padrão ácido gálico) em meio básico, gerando os ânions fenolatos. A partir daí, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin-Ciocalteu, na qual, segundo Singleton et al, (1965) o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul.

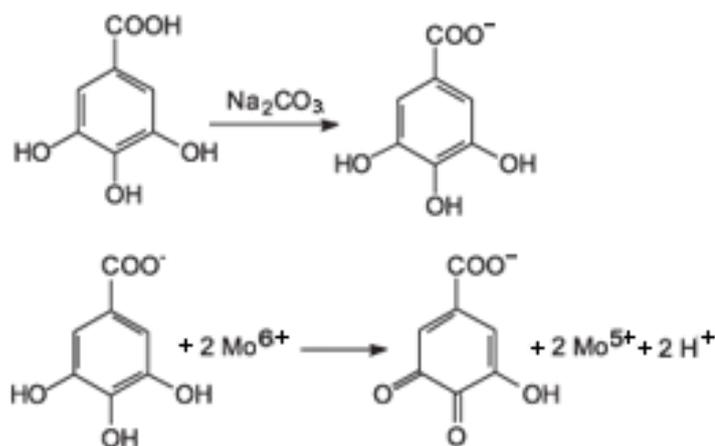


Figura 5. Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.

3.4.3. Capacidade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP)

O ensaio FRAP (do inglês Ferric Reducing Antioxidant Power ou poder antioxidante de redução do Ferro) foi desenvolvido inicialmente para quantificar o ácido ascórbico em soro de plasma (BENZIE; STRAIN, 1996). Este método está baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , quando esta reação ocorre na presença de 2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ). Em condições ácidas, a redução é acompanhada por uma complexação com o Fe^{3+} dando origem a cromóforos de cor azul intenso, com absorção máxima a 593 nm (Figura 6). Este ensaio oferece resultados rápidos e reprodutíveis, mas apresenta como desvantagens o fato da curva padrão ser realizada com um antioxidante que seja solúvel em água como o ácido ascórbico ou o Trolox, o que inviabiliza a determinação dos antioxidantes presentes em uma matriz complexa. No entanto, muitos estudos sobre plantas e alimentos utilizam esse método em conjunto com outros ensaios.

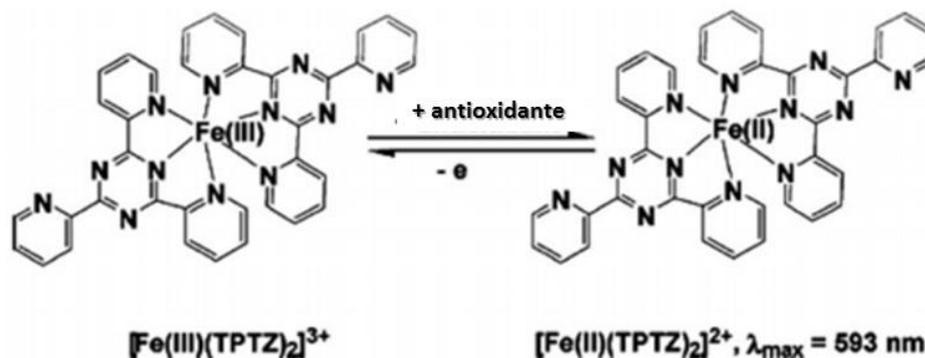


Figura 6. Redução do Fe^{3+} e formação do complexo TPTZ (2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina).

3.4.4. Flavonoides

O ensaio espectrofotométrico é baseado na formação de um complexo de alumínio, após a adição de Al (III), formando cromóforos que tornam a solução amarela (Figura 7). Este ensaio é um dos procedimentos mais comumente utilizados para a chamada determinação de flavonoides totais, considerado como um parâmetro importante para avaliar amostras de alimentos ou plantas medicinais. Este método, proposto inicialmente por Cristo e Muller (1960) foi idealizado para a análise de materiais à base de plantas, tendo sofrido algumas modificações ao longo dos anos. O método, que envolve a medição a 410-430 nm após a adição de AlCl_3 é seletivo apenas para flavonas (por exemplo, crisina, apigenina, luteolina) e flavonóis (quercetina, miricetina, rutina), deste modo, a expressão teor “total de flavonoides” não é adequada, uma vez que são dependentes da estrutura dos flavonoides individuais presentes e não determinam flavanonas e flavanonóis. Deste modo, os diferentes tipos de flavonóis, principalmente a quercetina são utilizados como compostos-padrão para a expressão dos resultados.

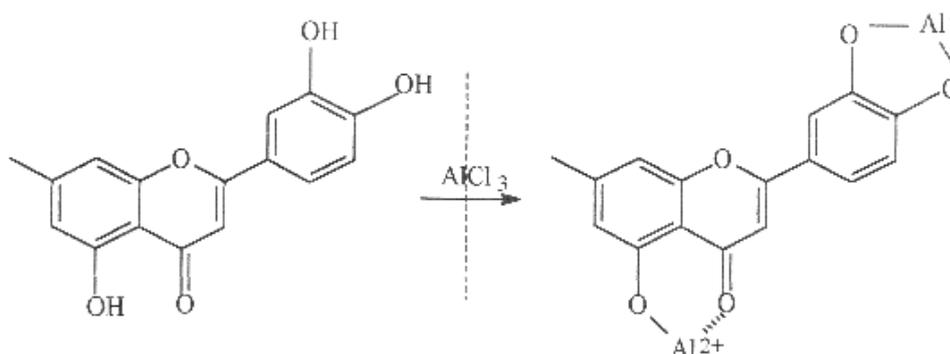


Figura 7. Complexação dos flavonoides com Cloreto de alumínio (AlCl_3).

3.4.5. Determinação do ácido ascórbico

O método de Tillmans (BENASSI; ANTUNES, 1988) trata-se de uma titulação utilizando o indicador 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI). Neste método, o ácido ascórbico reduz o DCFI a uma solução incolor e no ponto final da titulação, o excesso do indicador não reduzido confere à solução ácida uma coloração rosa. O método é muito simples e difundido, não entanto o principal problema está mais relacionado com o fato de que o ácido ascórbico pode ser oxidado para ácido dehidroascórbico, que é fisiologicamente ativo, mas não reage com o reagente de titulação, enquanto a oxidação do ácido ascórbico é reversível, ácido dehidroascórbico é instável e sofre uma nova decomposição irreversível.

4. METODOLOGIA

4.1. RESÍDUOS DE FRUTAS E HORTALIÇAS

4.1.1. Amostras vegetais utilizadas

As amostras vegetais utilizadas foram frutas e hortaliças, onde as hortaliças selecionadas foram: abobrinha (*Cucúrbita pepo*), alface (*Lactuca sativa*), cenoura (*Daucus carota*), espinafre (*Spinacea oleracea*), hortelã (*Mentha s.p.*), inhame (*Colocasia esculenta*), pepino (*Cucumis sativus*) e rúcula (*Eruca sativa*). As frutas selecionadas foram: laranja seleta (*Citrus sinensis*), maracujá (*Passiflora edulis*) e melancia (*Citrullus lanatus*). Todas as amostras foram adquiridas frescas em mercado local na cidade do Rio de Janeiro e transportadas ao laboratório para uso imediato. As frutas e hortaliças foram lavadas em água corrente, e posteriormente, sanitizadas com hipoclorito de sódio a 200 ppm por 15 minutos. Em seguida, foram enxaguadas com água deionizada.

As frutas e hortaliças foram utilizadas de forma integral (incluindo talos, sementes, bagaços, cascas etc.). Após sanitização, foram fracionadas, pesadas em balança convencional e processadas em uma centrífuga, tipo juicer (Vicini, VCC 7000, Brasil), segundo Martins et al. (2011).

4.1.2. Obtenção da farinha de frutas hortaliças (FFH)

Os resíduos de frutas e hortaliças obtidos após processamento, foram imediatamente submetidos a dois diferentes processos de secagem i) secagem em estufa ventilada (SEE) e ii) liofilização (LIO). Para cada tipo de secagem, foram preparados três lotes diferentes, caracterizados pela data de compra das matérias primas em dias diferentes.

4.1.2.1. Secagem em estufa

Os resíduos foram secos em estufa ventilada (Marconi, MA035, Brasil) a 65 °C por 5 horas. Após secagem, os resíduos foram triturados em processador de alimentos (RI 2035, Philips Wallita, Brasil) e secos novamente em estufa ventilada a 90 °C por 1 hora, de acordo com o descrito por Ferreira et al. (2015).

4.1.2.2. Liofilização

Os resíduos foram dispostos uniformemente em formas de alumínio, formando uma fina camada de aproximadamente 1,5 cm e congelados em ultrafreezer vertical a -80 °C (IULT 335 D, Indrel, Brasil) por pelo menos 48h. Os resíduos congelados foram transportados em nitrogênio líquido e submetidos à liofilização (Liotop, L101, Brasil), por aproximadamente 20 horas.

4.1.2.3. Trituração por moinho de rotor do tipo ciclone

Após secagem, as FFH (SEE e LIO) foram trituradas em moinho de rotor do tipo ciclone (Tecnal, 651/2, Brasil) e tamisadas manualmente em peneira com abertura de malha de 45 “mesh Tyler” (350 µm). As FFH foram pesadas em balança analítica (Edutec, 02001002, Brasil), e armazenadas em embalagens de alumínio assépticas e seladas a quente (Imap, FM 3060, Brasil).

4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FFH E DOS EXTRATOS

4.1.1. Análise estrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise estrutural por MEV, foram utilizados três lotes de cada FFH (SEE e LIO), antes e pós-extração (conforme item 4.5.1). Nos ensaios pós-extração, foram contemplados todos os resíduos obtidos a partir da aplicação dos 12 tratamentos independentes, determinados pelo planejamento fatorial reduzido (conforme item 4.5.1), a partir de um único lote (Lote 1) totalizando 24 amostras. Após o processo de extração, os resíduos foram secos em estufa ventilada a 55 °C por 1 hora, macerados manualmente em gral de porcelana, armazenados em embalagens de alumínio assépticas, seladas a quente (Imap, FM 3060, Brasil) e mantidas em temperatura ambiente (± 24 °C) até o momento das análises.

As análises por MEV foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Pontifícia Universidade Católica (PUC) do Rio de Janeiro. As amostras foram fixadas com fita de carbono de dupla face sobre um suporte de alumínio (*stubs*), recobertas com película de ouro (40-50 nm) por 100 segundos em um evaporador (Bal-tec-SCDa50, Leica, Alemanha) e visualizadas em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, ZSN-6510 LV, Inglaterra), em uma tensão de

aceleração de 20kV. As imagens foram registradas nas seguintes magnificações de 30, 100, 200, 500, 1000 e 1500x, e diâmetro de feixe de 40 ss (spot size).

4.1.2. Análise colorimétrica

A coloração dos três lotes de cada farinha (SEE e LIO) foi avaliada em triplicata a partir de um colorímetro (Konica Minolta, CM 5, Japão). A placa de cor branca foi utilizada como padrão para a calibração (100%) e as medições foram feitas contra o padrão preto (0%). Os valores das coordenadas L^* , a^* , b^* de cada amostra de FFH foram avaliados por refletância (Rao et al., 2010). A análise colorimétrica dos extratos líquidos obtidos a partir das FFH (conforme item 5.3.1 do planejamento fatorial) foi determinada em triplicata por transmitância. A coordenada L^* representa luminosidade e varia de 0 a 100, onde valores elevados representam cores claras e a coordenada de cromaticidade a^* refere-se às cores de verde (-60) a vermelho (+60) e b^* refere-se às cores de azul (-60) a amarelo (+60) (Figura 8).

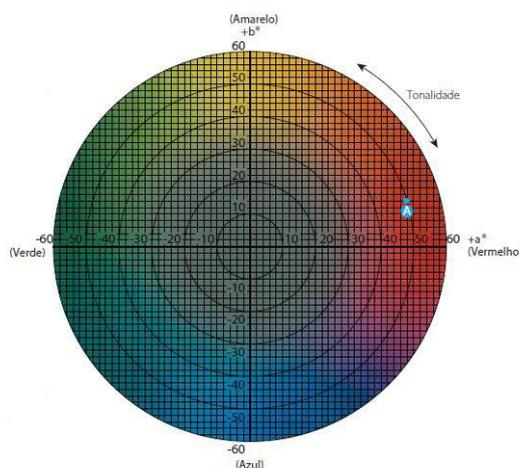


Figura 8 - Coordenadas de cromaticidade.

4.3. ESTUDO PRELIMINAR DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE AGITAÇÃO

4.3.1. Obtenção dos extratos por diferentes métodos de agitação

Foram pesados aproximadamente 100 mg de FFH SEE em balança analítica e adicionados 10 mL de extrator, obtendo-se a concentração final de 10 mg/mL. Os extratores utilizados foram: H_2O , Metanol p.a. (Met), Metanol 50% (Met50) e Metanol 50%: Acetona 70% (MetAc) na proporção de 1:1. Todos os solventes utilizados foram

da marca B'Herzog (Brasil) e todas as diluições foram realizadas com H₂O Milli-Q (PureLab Classic, Elga Veolia, Inglaterra). Após o preparo, as amostras foram submetidas a quatro processos de agitação, conforme apresentado abaixo:

- i) homogeneização em agitador de alto desempenho (Ultra-Turrax T25, IKA, Alemanha) durante 10 minutos a 2.500 rpm e 4°C (UT);
- ii) homogeneização em mini agitador de alto desempenho (Ultra-Turrax tube disperser, IKA, Alemanha) durante 2 minutos a 22.000 rpm e ± 24°C (MT);
- iii) homogeneização em shaker (Tecnal, TE 420, Brasil) durante 60 minutos a 140 rpm e ± 24°C (SK);
- iv) homogeneização em mini agitador de alto desempenho durante 2 minutos a 22.000 rpm, seguido de shaker durante 60 minutos a 140 rpm, e ± 24°C (SK+MT).

Todos os processos de extração foram realizados ao abrigo da luz. Os extratos obtidos foram centrifugados (MegaFuge, Thermo Scientific, EUA) a 3.000 x g por 20 minutos, filtrados com filtro de papel analítico, e transferidos para tubos Falcon (50 mL). Os extratos foram armazenados a -4 °C até o momento das análises.

4.3.2. Determinação da capacidade de eliminação do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Para avaliação da eficiência dos métodos de agitação, os extratos obtidos a partir da FFH SEE foram analisados pelo método de DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSSET, 1995), modificado por Miliuskas et al. (2004). O método escolhido, trata-se de uma metodologia simples, rápida e sensível, conveniente para realização de varredura (*screening*) de compostos de diferentes polaridades. Para realização das análises, preparou-se no mesmo dia da análise uma solução estoque de DPPH (60 μM) em meio metanólico, e a partir desta foram preparadas diluições nas concentrações de 8, 16, 24, 32 e 40 μM. As absorbâncias foram lidas a 515 nm contra um branco com metanol puro. Somente foram consideradas, soluções de DPPH que demonstraram coeficientes de determinação (R²) acima de 0,9999 (anexo 1)

Para realização das análises, foram adicionadas alíquotas de 2,0 mL da solução de DPPH (60 μM) e alíquotas dos extratos (50, 100, 500, 750 e 1.000 μL) completando-se o volume para 3 mL, com suas respectivas soluções extratoras. Os brancos foram preparados, adicionando-se as soluções extratoras de cada extrato no lugar da solução de DPPH. As misturas foram agitadas vigorosamente em vortex e

mantidas ao abrigo da luz por 60 min a ± 24 °C. Todas as análises foram realizadas em quadruplicada e os resultados expressos em base seca. O decaimento da coloração do radical DPPH foi determinado medindo-se a absorbância a 515nm em espectrofotômetro UV-Vis (2700, Shimadzu, Japão). A capacidade de eliminação de radicais DPPH foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Capacidade de eliminação do radical DPPH} = \left(\frac{(A_1 - B_0) - A_0}{A_0} \right) \times 100$$

Sendo A_0 a absorbância do controle (solução estoque de DPPH), A_1 a absorbância do DPPH na presença do extrato, e B_0 a absorbância do branco. Os resultados foram expressos como a capacidade de eliminação de 50% do radical DPPH (EC_{50}).

4.3.3. Obtenção dos extratos a partir do método de agitação selecionado

Esta segunda etapa do estudo preliminar, consistiu na avaliação da preservação de compostos bioativos em FFH obtida por dois diferentes métodos de secagem (SEE e LIO). A partir deste ponto, foi utilizado o método de agitação previamente selecionado na primeira etapa deste estudo preliminar, conforme descrito acima.

4.3.4. Determinação da capacidade de eliminação do radical DPPH

Para avaliação da capacidade de eliminação dos radicais DPPH, nos extratos obtidos a partir de FFH SEE e LIO foi utilizada a mesma metodologia descrita no item

4.3.5. Determinação de compostos fenólicos totais

O teor de fenólicos totais (FT) nos extratos de FFH SEE e LIO foi determinado pelo método de Folin & Ciocalteu's (SINGLETON; ROSSI, 1965) com algumas modificações. Foram adicionadas alíquotas de 2,5 mL de solução de Folin & Ciocalteu's a 10% (Sigma-Aldrich), 2,0 mL de carbonato de sódio anidro (Sigma Aldrich) a 4 %, e alíquotas dos extratos (250, 500, 750, 1.000 μ L) completando-se o volume final para 5,5 mL com suas respectivas soluções extratoras. As concentrações finais foram de 0,45; 0,90; 1,36; 1,82 mg FFH/mL. As misturas foram agitadas vigorosamente em vortex, incubadas por 120 minutos a ± 24 °C, ao abrigo da luz. A curva de calibração foi preparada com ácido gálico (Sigma Aldrich) nas concentrações de 0,12 a 30 μ g/mL. As absorbâncias foram determinadas a 750 nm. Todas as análises foram realizadas em quadruplicada e os resultados expressos como mg de equivalentes de ácido gálico/g de amostra seca.

4.4. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

4.4.1. PLANEJAMENTO FATORIAL REDUZIDO

Os experimentos foram conduzidos seguindo um planejamento fatorial reduzido com 4 fatores e 4 pontos centrais (Statistica 7.0) (Tabela 4). A combinação dos fatores resultou em 12 ensaios, sendo os 4 últimos (9 ao 12) repetições do ponto central, utilizadas pelo software para estimar o erro padrão. Foram avaliados os três lotes de cada FFH (SEE e LIO), totalizando 72 ensaios. As variáveis estudadas foram: pH (3, 7,5 e 12); solventes (acetona p.a. (Act), álcool etílico p.a. (EtOH) e H₂O), proporção de solventes (Act:H₂O (1:1), EtOH:H₂O (1:1), H₂O, Act:EtOH:H₂O (1:1:2)); e tempo (0,5, 12,25 e 24h). Todos os reagentes utilizados foram da marca da B'Herzog. Todos extratos foram preparados pelo método previamente estabelecido, agitação em shaker a 140 rpm por 60 minutos a $\pm 24^{\circ}\text{C}$.

Tabela 4. Ensaios do planejamento fatorial reduzido.

Ensaio	Extrator	Proporção	pH	Tempo (h)
1	H ₂ O	p.a.	3,0	0,5
2	EtOH:H ₂ O	1:1	12,0	0,5
3	Act:H ₂ O	1:1	12,0	0,5
4	EtOH: Act	1:1	3,0	0,5
5	H ₂ O	p.a.	12,0	24
6	EtOH:H ₂ O	1:1	3,0	24
7	Act:H ₂ O	1:1	3,0	24
8	EtOH:Act	1:1	12,0	24
9	EtOH:Act:H ₂ O	1:1:2	7,5	12,25
10	EtOH:Act:H ₂ O	1:1:2	7,5	12,25
11	EtOH:Act:H ₂ O	1:1:2	7,5	12,25
12	EtOH:Act:H ₂ O	1:1:2	7,5	12,25

4.4.2. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

4.4.2.1- *Determinação da capacidade de eliminação do radical DPPH*

Foram utilizados os extratos obtidos a partir dos ensaios de diferentes condições de extração para SEE e LIO, conforme metodologia descrita em 4.3.2. As alíquotas utilizadas dos extratos foram de 10, 25, 50 e 100 µL e as concentrações finais de 0,03; 0,08; 0,17 e 0,33 mg/mL. A curva de calibração foi preparada a partir de alíquotas de uma solução estoque de 400 µM de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 0,7 a 9,3 µM. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como µmol de equivalentes Trolox por grama de amostra seca.

4.4.2.2. *Determinação da atividade antioxidante pelo método de FRAP*

Foi utilizada a metodologia descrita por Benzie & Strain (1996) com algumas modificações. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise contendo 25 mL de tampão acetato (0,3 M, pH 3,6), 2,5 mL de TPTZ (10 mM em 40 mM HCl) e 2,5 mL de FeCl₃ (20mM). Para realização do ensaio, foram preparados extratos nas concentrações de 0,25, 0,5, 0,75, 0,9 mg/mL. A curva de calibração foi preparada a partir de sulfato ferroso nas concentrações de 100, 250, 500, 750, 1.000, 1.250 µM. Alíquotas de 90 µL de cada diluição do padrão e da amostra foram adicionadas a 270 µL de água Milli-Q e 2,7 mL do reagente FRAP em tubos de ensaio. Os tubos foram homogeneizados em vortex e incubados em banho-maria (Alb 250C, lab 1000, Brasil) a 37 °C por 30 minutos. As leituras foram realizadas a 595 nm utilizando-se o reagente FRAP como branco. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mmol Fe²⁺ por grama de amostra seca.

4.4.3. *Determinação de compostos fenólicos totais*

O teor de fenólicos totais foi determinado como descrito em 4.3.3. As alíquotas utilizadas dos extratos foram de 10, 25, 50 e 100 µL, nas concentrações finais de 0,03; 0,08; 0,17 e 0,33 mg/mL. Todas as análises foram realizadas em triplicata, resultados expressos em mg de EAG/g de amostra seca.

4.4.4. Determinação do teor de flavonoides

Para determinação do teor de flavonoides, foi utilizada a metodologia descrita por Woisky e Salatino (1998). Para realização do ensaio, foram utilizadas alíquotas de 0,5 mL dos diversos extratos das FFH SEE e LIO (10 mg/mL) e 0,5 mL do padrão de quercetina (Sigma Aldrich), nas concentrações de 2, 4, 8, 20 e 50 µg/mL. A estas alíquotas foram acrescidas 0,5 mL de solução de $AlCl_3$ a 2% em tubos de ensaio. Os tubos foram homogeneizados em vortex e incubados ao abrigo da luz a ± 24 °C por 60 minutos. Os brancos dos extratos foram preparados a partir de 0,5 mL das amostras, completando-se o volume para 1 mL com a respectiva solução extratora. As absorbâncias foram medidas a 420 nm. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como mg de equivalentes de quercetina por grama de amostra seca.

4.4.5. Determinação do teor de ácido ascórbico

O teor de ácido ascórbico foi determinado pelo método de Tillmans, modificado por Benassi e Antunes (1988). Para a realização do ensaio, 5 mL dos extratos (10 mg/mL) foram adicionados de 25 mL de solução de ácido oxálico a 4%, na concentração final de 1,66 mg/mL. Após diluição, as amostras foram tituladas com 2,6-diclorofenol indofenol (DCFI) (0,25 mg/mL) até a viragem do ponto final para coloração rósea persistente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, onde cada replicata equivale a um lote diferente de FFH. O teor de ácido ascórbico foi calculado levando-se em conta o fator de correção do DCFI, o volume gasto na titulação e a massa da amostra. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100 gramas de amostra seca.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA com dois fatores) e as médias comparadas através dos testes de Tukey e Bonferroni (nível de confiança de 95%, $p < 0,05$), utilizando-se os programas GraphPad Prism 5.0 e XLSTAT 2015, respectivamente. O programa Statistica 7.0 foi utilizado para elaboração e análise de significância, das variáveis que compõem o planejamento fatorial reduzido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resíduos de frutas e hortaliças são matérias-primas ricas em compostos bioativos. O processamento adequado destas matrizes deve viabilizar uma melhor preservação e disponibilização dos compostos antioxidantes. O objetivo deste trabalho foi caracterizar resíduos de frutas e hortaliças, frente às modificações estruturais e de acessibilidade de compostos bioativos, ocasionadas por diferentes condições de secagem e de extração.

Os resíduos utilizados neste estudo para produção das FFH SEE e LIO, são oriundos da produção de uma bebida isotônica à base de frutas e hortaliças integrais (MARTINS et al., 2011), ou seja, utilizou-se cascas, talos, bagaços, sementes etc. O peso seco da FFH SEE corresponde a aproximadamente 10% do peso total de resíduo úmido. A composição centesimal, compreende umidade (5,9%), cinzas (4,9%), proteínas (9,5%), lípideos (5,0%), fibras alimentares totais (48,4%), onde as fibras insolúveis representaram 80% e os carboidratos livres 26,5% (Ferreira et al, 2015; Roberta et al, 2014). Além disso, estudos prévios realizados mostraram que o consumo diário de FFH melhorou os sintomas da constipação em 87,5% dos voluntários avaliados, quando comparados ao grupo controle (Andrade et al., 2014). Os autores propuseram que o alto teor de fibras alimentares, juntamente com o potencial antioxidante da FFH, pode superar a constipação e agregar valor nutricional.

As concentrações de micronutrientes e substâncias bioativas em alimentos de origem vegetal podem variar de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como a variedade da espécie, estágio de maturidade, efeitos climáticos ou geográficos, práticas agrícolas e composição do solo (OLIVEIRA et al., 2009) . Para levar em conta estas variações, neste trabalho foram elaborados três lotes distintos de FFH SEE e LIO, preparados a partir de matérias-primas adquiridas em dias diferentes.

5.1. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE POR DIFERENTES MÉTODOS DE AGITAÇÃO

A extração e avaliação da capacidade antioxidante de compostos bioativos extraídos de matrizes vegetais vem sendo extensamente investigada, especialmente

pela aplicação de tecnologias envolvendo a extração sólido-líquido associada a outras tecnologias ou não (ANDREO; JORGE, 2006; NASCIMENTO; ARAÚJO; MELO, 2010). A adição de extratos de origem natural ricos em compostos bioativos tem sido uma estratégia da indústria para conferir maior funcionalidade aos alimentos.

Resíduos de frutas e hortaliças representam uma fonte sustentável de compostos antioxidantes, possibilitando aplicações eficientes como ingredientes funcionais. No entanto, devido à composição rica em biopolímeros, tais como fibras alimentares e à diversidade química de alguns compostos antioxidantes, tais como os fenólicos, faz-se necessário estudar a influência das variáveis que envolvem a extração destes compostos.

Neste trabalho, foram realizados dois estudos preliminares, onde o processo de extração escolhido foi o sólido-líquido por agitação. Na primeira etapa, foram avaliadas quatro condições de extração aplicando-se tempos e intensidades de dispersão ou homogeneização diferentes. Para cada condição de extração, foram utilizadas quatro diferentes soluções extratoras, e a avaliação da efetividade foi avaliada pelo teste de eliminação dos radical DPPH (EC_{50}).

Todos os extratos obtidos a partir da FFH SEE, apresentaram elevada atividade antioxidante, entretanto a ação foi diferenciada entre os extratores e métodos de agitação. O desempenho dos métodos de agitação, está relacionado com uma maior efetividade na extração dos compostos antioxidantes, traduzida por baixas concentrações inibitórias (EC_{50}) do radical DPPH. Dos extratos obtidos a partir da FFH SEE, o método MT+SK, com exceção do extrator aquoso, apresentaram significativamente menores concentrações inibitórias (EC_{50}) do DPPH, mostrando uma maior efetividade na extração dos compostos antioxidantes (Tabela 5). Quando comparados em relação à porcentagem de inibição do radical de DPPH, o método de agitação em MT mostrou-se menos eficiente (89,8%) ($p < 0,05$) (Tabela 5) que os métodos de agitação SK e MT+SK (média 95,6%).

Tabela 5. Concentração de extrato (mg/mL) capaz de reduzir 50 % do DPPH (EC₅₀).

Extratores	Metodos de extração			
	MT	SK	MT+SK	UT
Met	0,37± 0,0021 ^{Aa}	0,17± 0,0031 ^{Ab}	0,16± 0,0046 ^{Ac}	0,17 ± 0,0009 ^{Ab}
Met50	0,16± 0,0064 ^{Ba}	0,19 ± 0,0022 ^{Bb}	0,16± 0,0045 ^{ABa}	0,17± 0,0008 ^{Ac}
MetAc	0,16± 0,0020 ^{Ba}	0,18± 0,0016 ^{Ab}	0,15± 0,0024 ^{Bc}	0,18 ± 0,0005 ^{Bd}
H2O	0,19 ± 0,0022 ^{Ca}	0,33± 0,0038 ^{Cb}	0,20 ± 0,0025 ^{Cc}	0,17 ± 0,0004 ^{Cd}

Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão (n=5). Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si (p<0,05).

Os resultados mostram que o tempo parece ser mais significativo do que a velocidade de agitação. Isto pode ser explicado pelo favorecimento da ação física, que provoca agitação das moléculas do solvente, aumentando a energia do meio, e conseqüentemente a produção de calor. O conjunto destes fatores, associados a um tempo prolongado, podem favorecer a liberação de compostos bioativos aderidos a matriz vegetal, como também a quebra de ligações moleculares, disponibilizando alguns compostos bioativos como, por exemplo, compostos fenólicos que podem estar na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998). Além disso, suaves variações de temperatura, induzidas pela agitação prolongada, são fatores importantes na extração de compostos sensíveis ao calor, como é o caso de alguns compostos antioxidantes, como por exemplo, as antocianinas. Também pode haver um aumento na taxa de difusão do solvente, intensificando a transferência de massa e auxiliando a extração, como também pode aumentar a cinética de transferência de massa, otimizando a extração e diminuindo assim o tempo necessário, para que se atinja o equilíbrio entre a amostra e a fase extratora (MARTENDAL, 2007).

Diante dos resultados obtidos, todos os métodos de agitação mesmo que, estaticamente, não foi o mais efetivo na redução do radical DPPH (EC₅₀), o método de agitação em SK (60 minutos), foi selecionado para aplicação nas próximas etapas do estudo, sendo considerados os seguintes parâmetros: obtenção de baixos valores de EC₅₀ próximos aos do método SK+MT; menores perdas de amostras no processo de extração, pela menor manipulação; proteção da luz durante todo o processo;

estabilidade térmica conferida pelo controle da temperatura ($\pm 24^{\circ}\text{C}$) e maior capacidade de processar amostras simultaneamente, até 18 amostras por processo.

Sendo assim, o método SK foi aplicado na segunda etapa deste estudo preliminar, para avaliar a preservação de compostos bioativos em FFH SEE e LIO, por meio dos testes do teor de FT e atividade antioxidante pelo método de redução DPPH.

Para o teste de DPPH, todos os extratos obtidos tanto da FFH SEE quanto da LIO, mostraram elevada capacidade antioxidante, por apresentarem baixas concentrações do extrato capazes de reduzir 50% do radical DPPH (EC_{50}) (Figura 9). Os extratores Met50 e MetAc foram significativamente ($p < 0,001$) mais efetivos na extração de compostos bioativos da FFH SEE, seguido dos extratores Met e H_2O . Enquanto que para os extratos da FFH LIO, o extrator Met foi significativamente mais efetivo ($p < 0,001$), seguido dos extratores Met50 e H_2O . A mistura de solventes de diferentes polaridades como nos extratores Met50 e MetAc parece ter favorecido a extração dos compostos antioxidantes. Enquanto que os extratos aquosos, demonstraram menor eficiência de extração.

Com relação aos diferentes métodos de secagem, a FFH LIO quando comparada a FFH SEE apresentou média significativamente inferior em relação à capacidade antioxidante ($16\% \pm 0,08$) (Figura 9). Os extratos Met50, MetAc e H_2O obtidos a partir da FFH SEE mostraram-se significativamente ($p < 0,001$) superiores quando comparados a FFH LIO, com exceção do extrator Met, onde não foi encontrada diferença significativa (Figura 9).

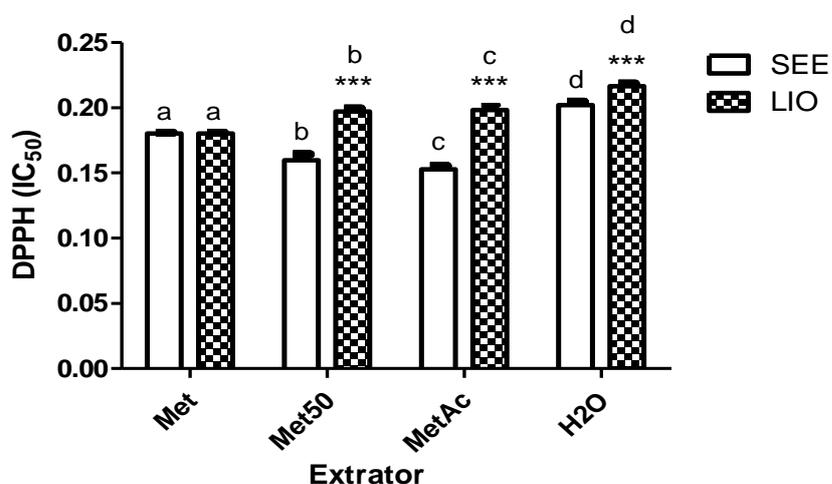


Figura 9. Avaliação da capacidade antioxidante de FFH SEE e LIO (EC_{50}). Os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão ($n=5$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os extratores para cada FFH (SEE e LIO) (Tukey, $p<0,5$), enquanto que * indica diferença estatística entre os diferentes tipos de secagem (Bonferroni, $p<0,001$).

Para determinação dos teores de FT, os resultados das FFH SEE e LIO foram calculados de acordo com as curvas de calibração do padrão de ácido gálico (**anexo 3.**) Em todos os extratores utilizados, a FFH LIO quando comparada a FFH SEE apresentou média significativamente inferior em relação ao teor de compostos fenólicos ($44\% \pm 0,06$) (Figura 10). Para ambas FFH, a solução extratora MetAc apresentou maior poder extrator ($24,9\%$ e $29,2\%$, respectivamente para SEE e LIO, $p<0,001$) (Figura 10).

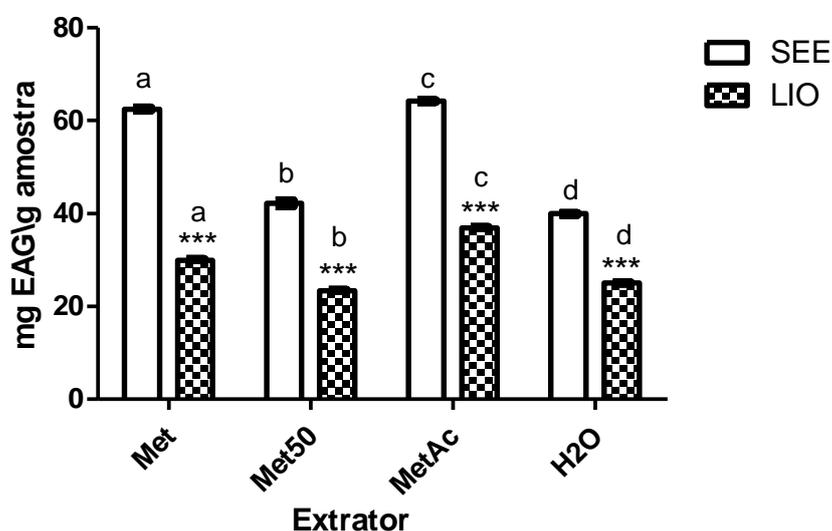


Figura 10. Avaliação do teor de Fenólicos Totais em FFH SEE e LIO expressos em mg EAG /grama de amostra seca. Os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão ($n=4$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os extratores para cada FFH (SEE e LIO) (Tukey, $p<0,5$), enquanto que * indica diferença estatística entre os diferentes tipos de secagem (Bonferroni, $p<0,001$).

Diante dos resultados, observa-se que a polaridade do solvente utilizado, tempo e temperatura de extração são fatores que influenciam na extração dos compostos antioxidantes (ANDREO & JORGE, 2006). O metanol possui uma polaridade superior à de outros extratores orgânicos muito utilizados como o etanol e acetona. Ainda que apresente polaridade inferior à água, o metanol, devido a sua menor cadeia hidrocarbônica, é considerado um solvente eficiente para extrair um número maior de compostos antioxidantes com polaridade elevada (NACZK; SHAHIDI, 2004; CHOI; JEONG; LEE, 2007; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Os resultados significativamente superiores, apresentados pela maior parte dos extratos metanólicos estudados, quando comparados aos hidro-metanólicos e aquosos, no que diz respeito à atividade antioxidante e ao teor de FT, podem ser relacionados então às características do solvente.

5.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FFH

5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura tem sido utilizada como ferramenta para caracterização da morfologia e estudo da superfície de materiais poliméricos (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007)). Na Figura 11 são apresentadas as micrografias, em diferentes magnificações, das FFH SEE e LIO. Apesar de revelarem uma distribuição heterogênea do tamanho das partículas, ambas FFH possuem tamanho médio de partícula de aproximadamente 350 μm . As matrizes vegetais das FFH apresentam diferenças estruturais marcantes. A FFH LIO apresentou caráter amorfo, com matriz expandida, partículas de superfície lisa, grande porosidade interna e maior diâmetro ($\pm 848 \mu\text{m}$) (Figura 11A, C e E), características estas que conferem uma maior higroscopicidade, típica de produtos liofilizados (CAPARINO et al., 2012; BEZERRA, 2014). Já a FFH SEE, apresentou uma matriz de caráter cristalino com partículas com aspecto fibroso em forma de haste e de menor diâmetro ($\pm 307 \mu\text{m}$), provavelmente devido ao encolhimento da matriz (colapso) (Figura 11B, D e F). Observou-se para ambas as FFH (Figura 11E e F), aderência de partículas ou grânulos menores, com formato arredondado e hexagonal. Na FFH LIO, notou-se que as partículas se localizavam no interior dos poros, enquanto que em SEE, as partículas contornavam toda a superfície das matrizes. É provável, que estes grânulos sejam moléculas poliméricas aderidas às matrizes vegetais, tais como amido ou maltodextrina, ou ainda açúcares de baixo peso molecular. No entanto, apesar do grânulo do amido, em sua forma original, ter forma esférica ou elíptica, não foi possível apontar grânulos de amido íntegros, uma vez que o grânulo pode perder o formato em decorrência da gelatinização, quando submetido a elevadas temperaturas (ASCHERI et al., 2006; DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007), como as aplicadas no processo de fabricação da FFH SEE.

No caso da FFH SEE, a presença de partículas aderidas à superfície, pode ser associada com o arraste de compostos hidrossolúveis para a superfície da matriz,

durante a evaporação da água, como ocorre em processos de secagem por circulação de ar quente em temperaturas brandas (<60 °C). Já na FFH LIO, o congelamento e a pressão gerada pelo vácuo durante o processo de liofilização, pode acarretar a condensação da superfície da matriz, enquanto o interior adquire uma característica porosa, fazendo com que a matriz se torne lisa e homogênea, isso faz com que parte dos compostos presentes na matriz vegetal, fiquem retidos em seu interior.

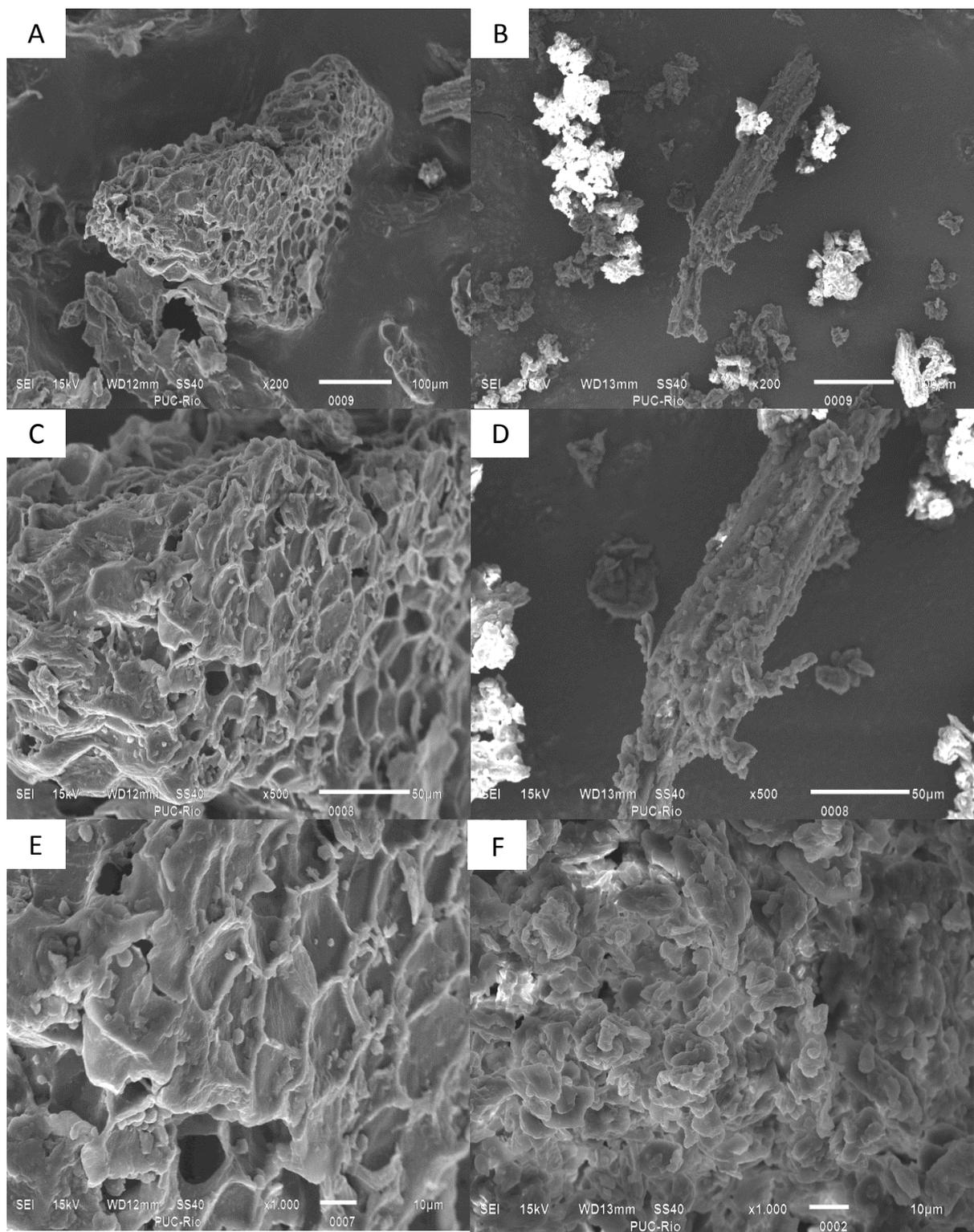


Figura 11. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das FFH LIO (A, C e E), SEE (B, D e F).

As FFH SEE e LIO também foram caracterizadas após os processos de extração nas diferentes condições estudadas, conforme planejamento fatorial reduzido. Em termos estruturais, observou-se mudanças importantes após extração, em geral em

ambas as FFH, o caráter de porosidade foi acentuado e em alguns casos específicos, houve uma maior penetração do solvente e remoção de compostos que se encontravam aderidos à matriz (Figuras 9-17A, B, C, D, E e F).

Para os resíduos pós-extração da FFH LIO, as condições de maior impacto foi em extratos aquoso, EtOH:H₂O e Act:H₂O, pH extremos (3,0 ou 12,0) e tempos mais curtos (0,5h) (Figuras 13, 14 e 15). Nestas condições, observou-se um desgaste da superfície da matriz, que pode indicar que houve uma maior extração dos compostos presentes na superfície. Em contrapartida, nos tempos mais prolongados de extração, houve aglomeração de partículas (Figura 15A, C e E) e notável encolhimento dos poros caracterizando possível colapso, principalmente pós-extração com EtOH:Act (Figura 16A, C e E). No caso da FFH SEE, em algumas condições de extração, tais como na presença do solvente EtOH:H₂O (pH 3 e 12) e Act:H₂O (pH3) (Figura 17, 13 e 19B, D e F respectivamente), a matriz adquiriu característica porosa e levemente expandida, o que caracteriza a adequada penetração do solvente.

Diante dos resultados obtidos na análise da estrutura das FFH SEE e LIO, obtidas pós-extração nas condições estudadas de diferentes proporções dos solventes, pH e tempo, observou-se que em algumas condições, os processos de extração não promoveram a solubilização (extração) dos compostos presentes na superfície ou nos poros da matriz, mas sim uma aglomeração de partículas. Estes resultados podem ser confrontados com os resultados de avaliação da capacidade antioxidante, nestas mesmas condições de ensaio.

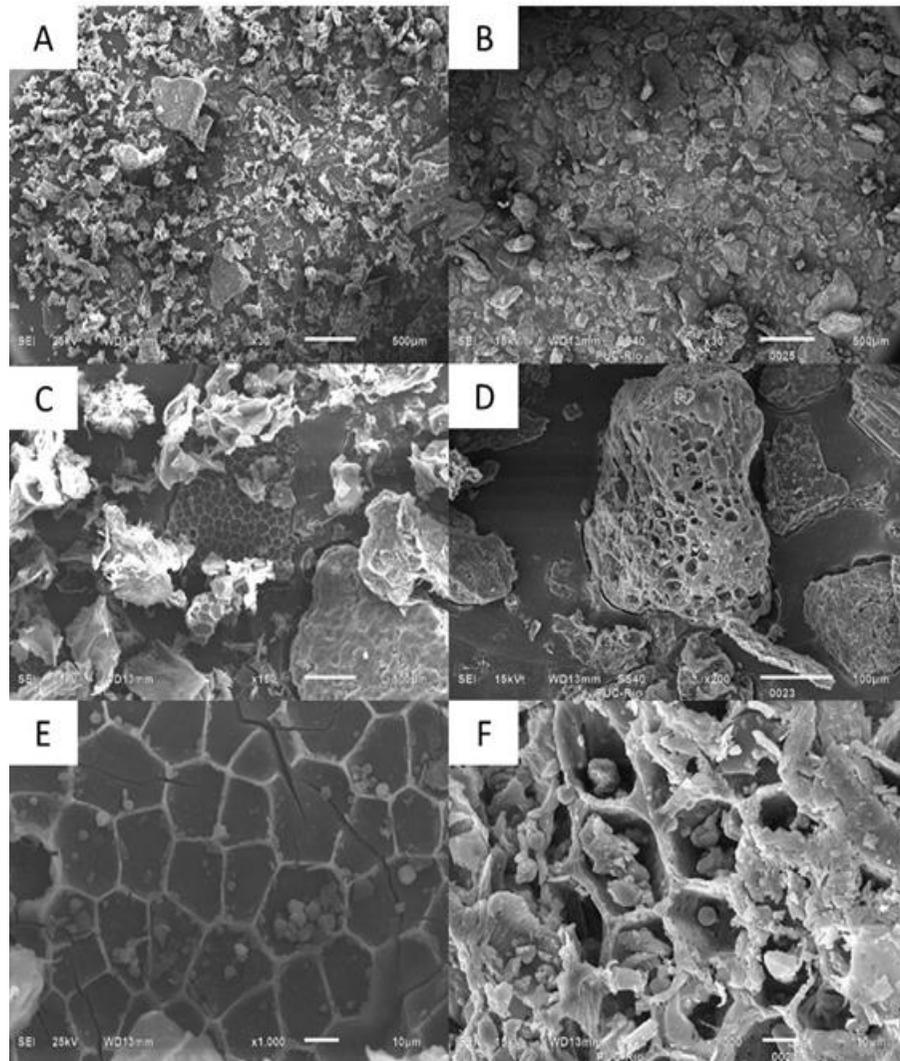


Figura 12. Fotomicrografias de FFH LIO (A, C e E) e SEE (B, D e F) pós extração com ensaio EtOH:Act, pH 3,0, 0,5h.

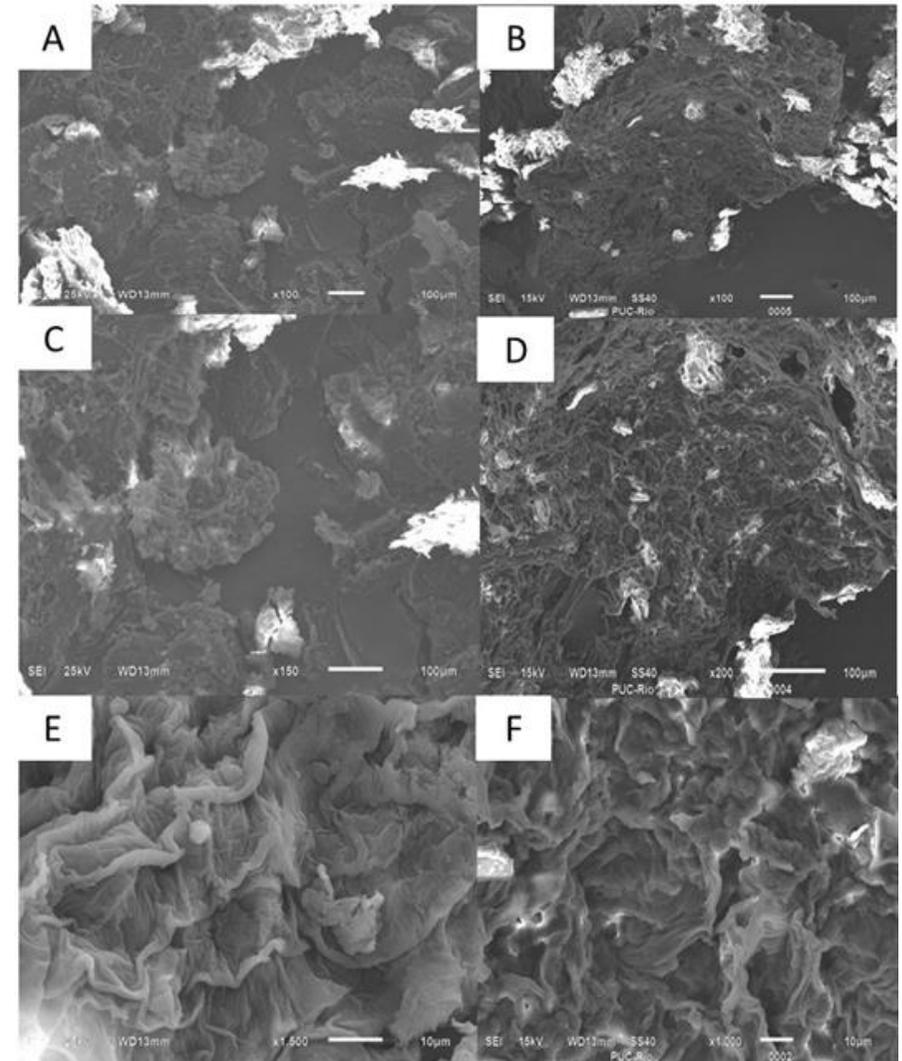


Figura 13. Fotomicrografias de FFH LIO (A, C e E) e SEE (B, D e F) pós extração com ensaio EtOH:H₂O, pH 12,0, 0,5h.

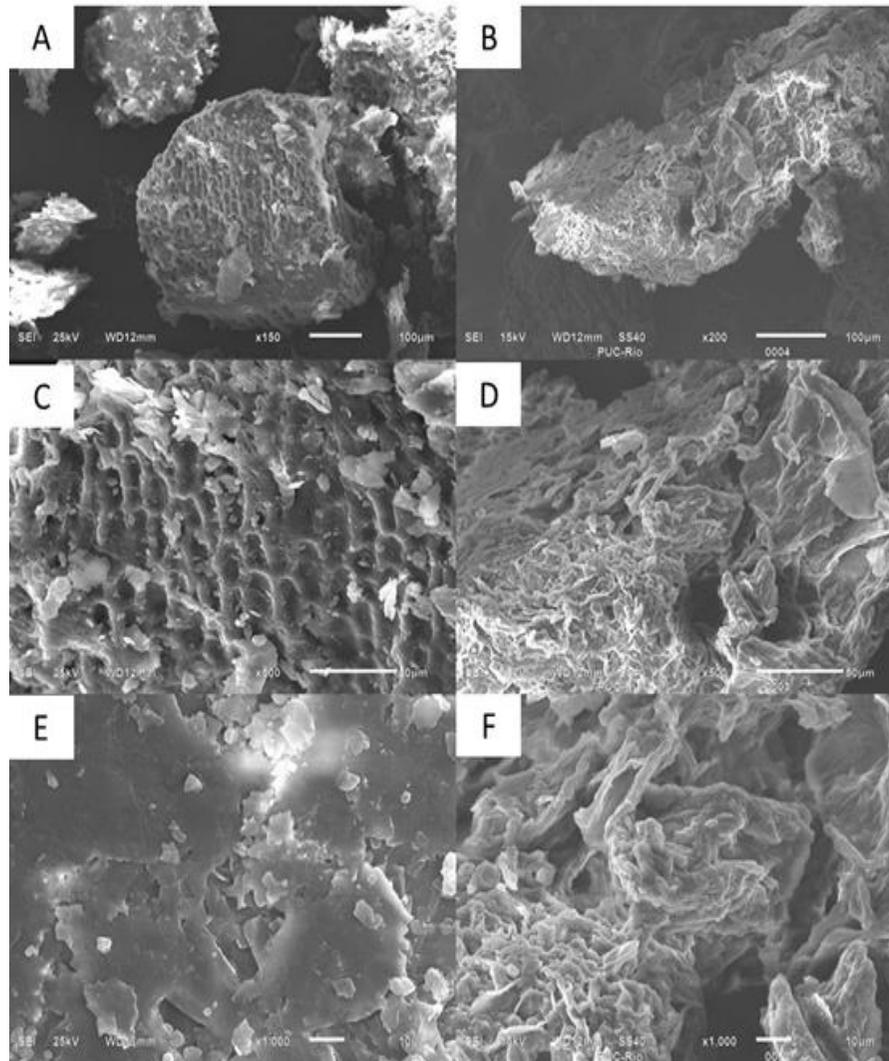


Figura 14. Fotomicrografias de FFH LIO (A, C e E) e SEE (B, D e F) pós extração com ensaio H₂O, pH 3,0, 0,5h.

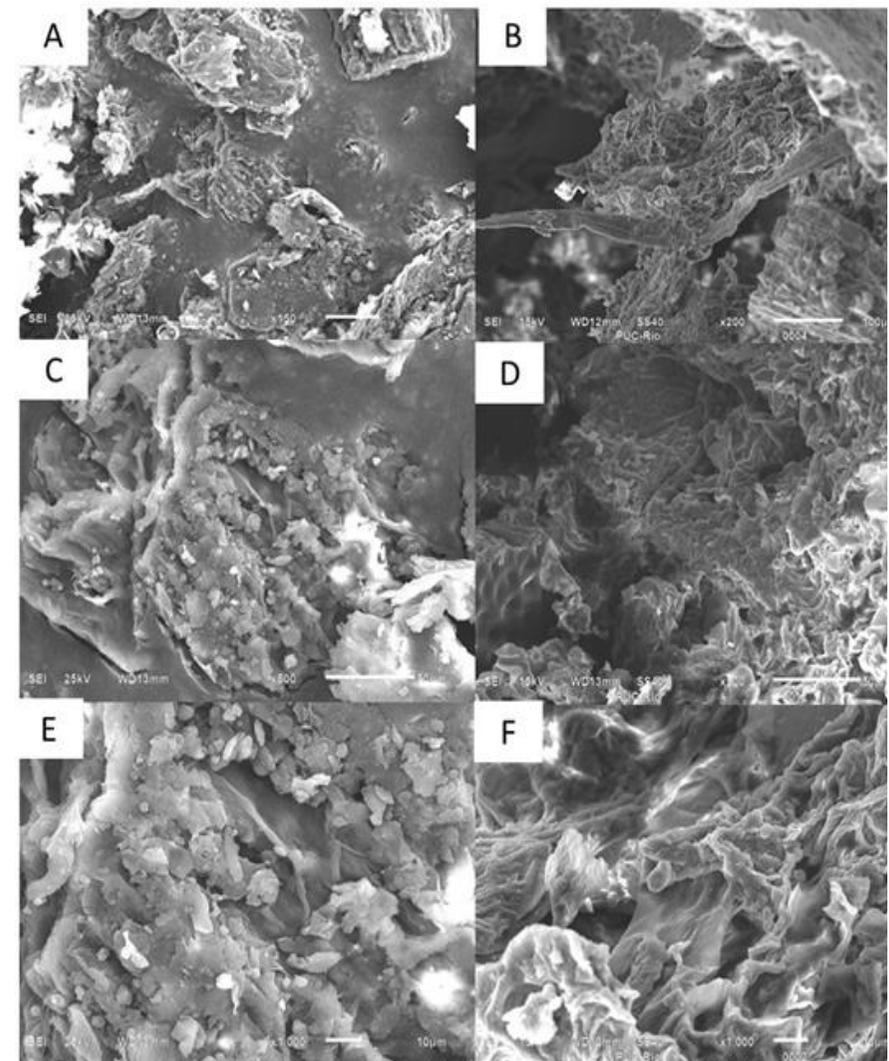


Figura 15. Fotomicrografias de FFH LIO (A, C e E) e SEE (B, D e F) pós extração com ensaio H₂O:Act, pH 12,0, 0,5h.

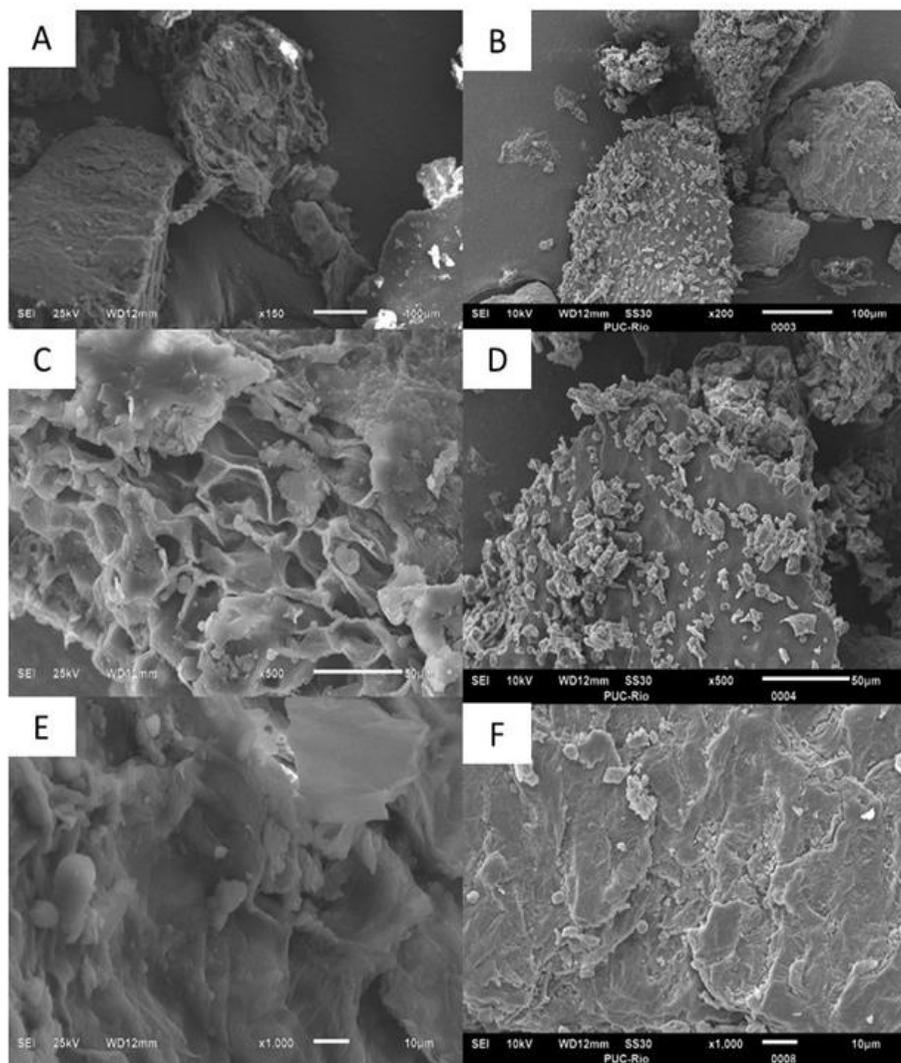


Figura 16. Fotomicrografias de FFH LIO (A, C e E) e SEE (B, D e F) pós extração com ensaio EtOH:Act, pH 12,0, 24,0 h.

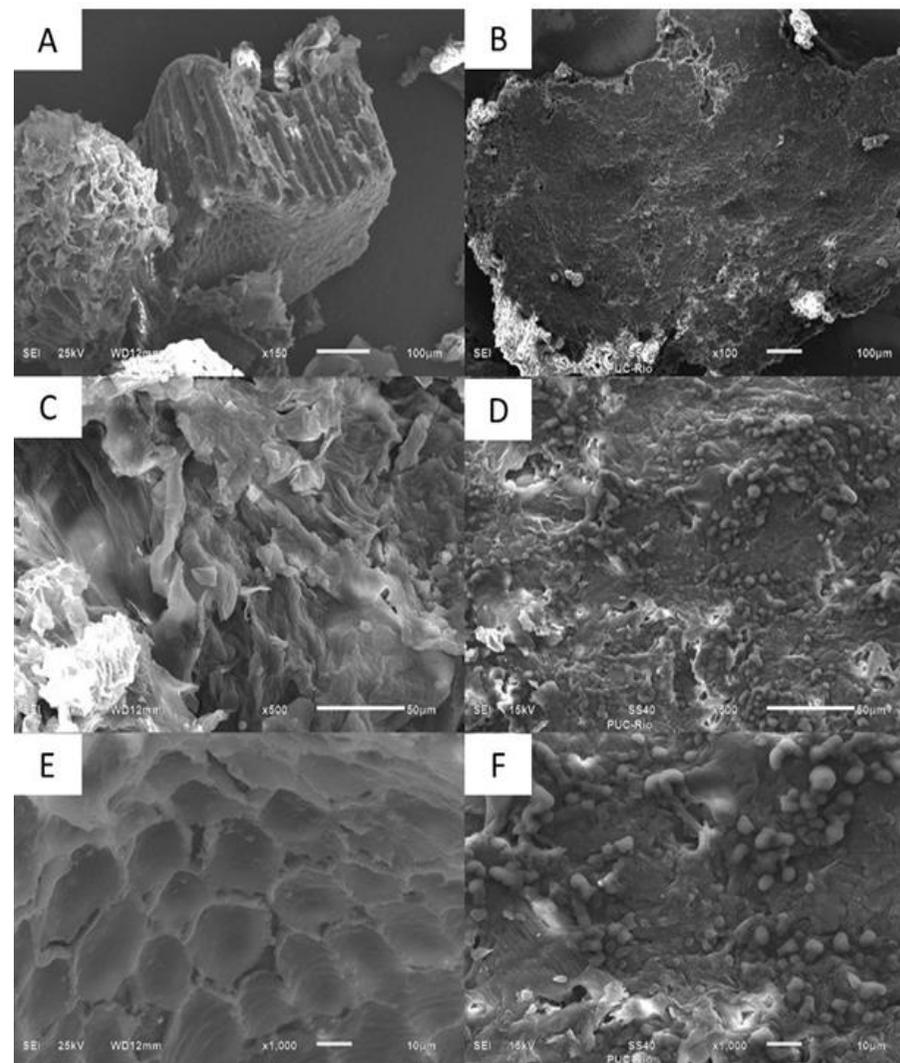


Figura 17. Fotomicrografias de FFH LIO (A, C e E) e SEE (B, D e F) pós extração com ensaio EtOH:H₂O, pH 3, 24h.

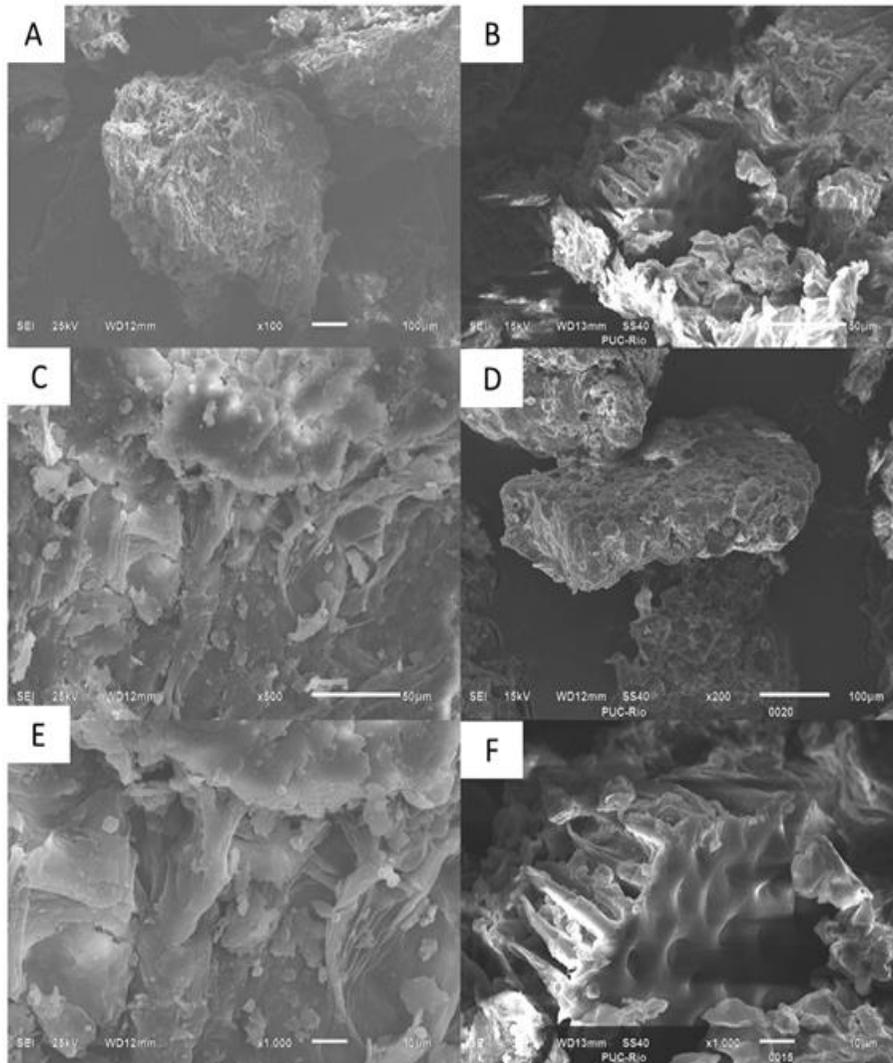


Figura 18. Fotomicrografias de FFH LIO (A, C e E) e SEE (B, D e F) pós extração com ensaio H₂O, pH 12,24h.

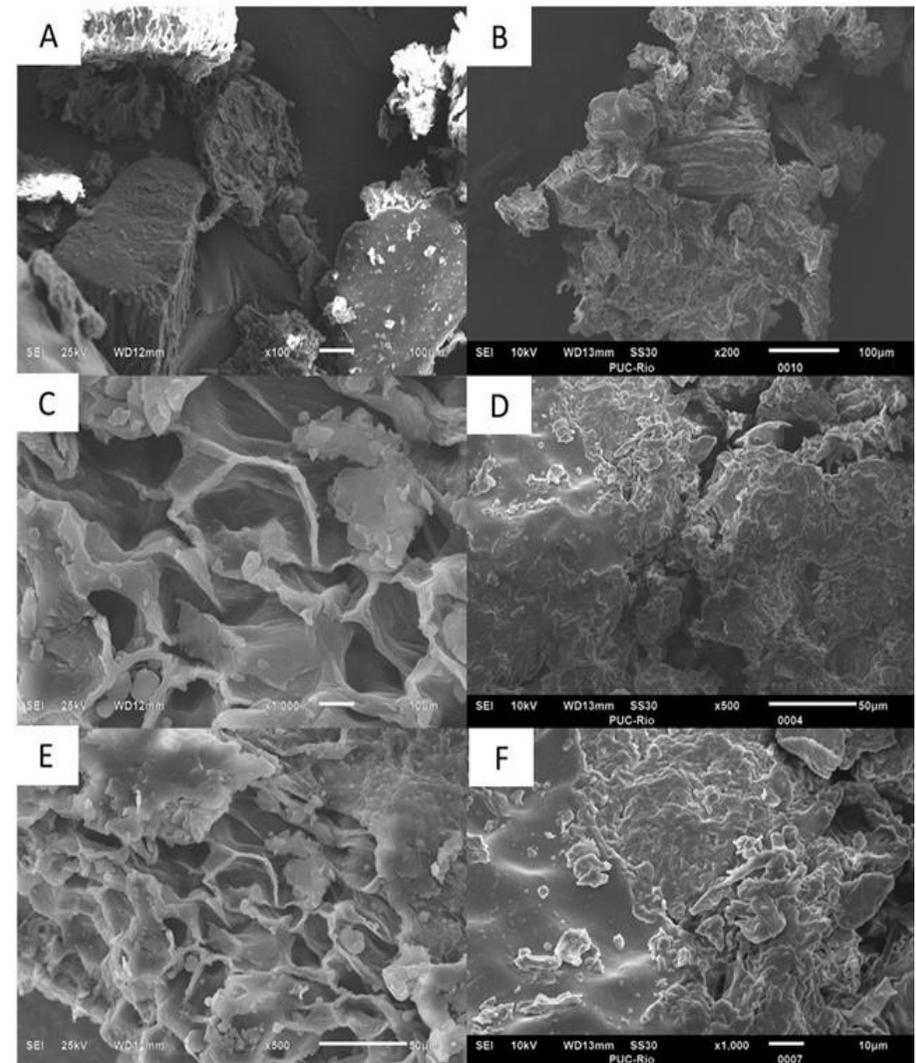


Figura 19. Fotomicrografias de FFH LIO (A, C e E) e SEE (B, D e F) pós extração com ensaio H₂O:Act, pH 3, 24h.

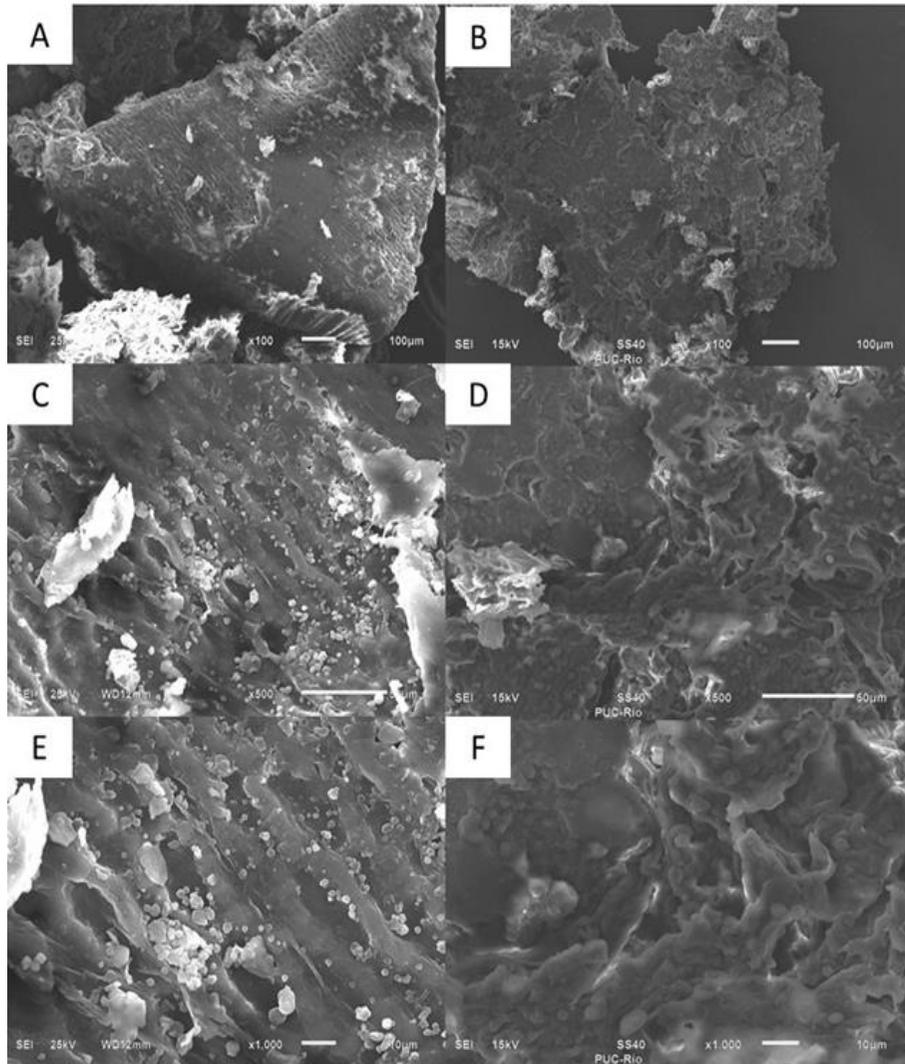


Figura 20. Fotomicrografias de FFH LIO (A, C e E) e SEE (B, D e F) pós extração com ensaio EtOH:Act:H₂O, pH 7,5, 12,25h.

5.2.2. Análise colorimétrica

A análise colorimétrica foi realizada para avaliar diferenças na coloração das FFH obtidas por diferentes condições de secagem. As medições nas coordenadas L*, a* e b* indicaram que não houve diferença significativa entre as FFH SEE e LIO (Tabela 6). Em ambas amostras (SEE e LIO), os valores de L* indicaram alta luminosidade, resultante de amostras claras, os valores positivos de b* indicaram fortemente a coloração predominante da FFH (amarelo) e os valores positivos de a* mostraram uma leve tendência para o vermelho.

Larrauri et al (1997) estudaram o efeito da secagem em temperaturas elevadas na qualidade de cascas de bagaço de uva vermelha e constataram que a secagem a 60 °C não alterou as características colorimétricas das amostras avaliadas. No entanto, quando secas a 140 °C, as propriedades colorimétricas foram significativamente diferentes do material liofilizado de referência, revelando uma perda da cor vermelha. No mesmo sentido, os resultados do presente estudo apontam que não houve mudança das características de coloração das FFH quando seca em estufa a 60 °C.

Tabela 6. Análise colorimétrica das FFH SEE e LIO.

Coordenada	FFH SEE	FFH LIO
L*	63,09±0,30 ^a	66,6±0,27 ^a
a*	4,52±0,08 ^a	3,15±0,04 ^a
b*	32,94±0,23 ^a	34,13±0,17 ^a

Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão (n=3) de cada lote. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (Tukey, p<0,05).

Com relação à análise colorimétrica dos extratos obtidos, todos apresentaram elevada luminosidade (L*>86), indicando soluções muito claras próximas do padrão branco (100), com exceção do extrato da FFH SEE que apresentou valores significativamente inferiores (p<0,05). Todos os valores da coordenada a* dos extratos obtidos da FFH LIO foram superiores com maior tendência para o verde (valores negativos) que os da FFH SEE, sendo as amostras 4 e 8 da FFH LIO significativamente diferentes (p<0,05) das demais,

apresentando tonalidades bem próximas do verde. Os valores de b^* foram muito variáveis (de 7,7 a 34,1 e de 5,5 a 76,8 para FFH SEE e LIO, respectivamente) e indicaram coloração amarelada predominante nos extratos. Os resultados seguiram o mesmo perfil entre SEE e LIO, sendo em ambos os casos o extrato 1 que apresentou menor valor de b^* e os extratos 4 e 8 que apresentaram valores mais elevados para b^* (amarelo). Estes resultados podem ser associado aos solventes utilizados, os ensaios 4 e 8 (EtOH:Act) são os menos polares, pois não possuem água em sua composição. No entanto, devido ao elevado número de amostras e à complexidade dos resultados estatísticos obtidos, não foi possível estabelecer uma relação entre as condições de extração utilizadas e os padrões colorimétricos obtidos para cada extrato (Tabela 7).

Tabela 7. Análise colorimétrica dos extratos de FFH SEE e LIO.

Ensaio	FFH SEE			FFH LIO		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
1	96,82±0,69dr	-0,79±0,09cd	7,38±2,25ab	97,71±0,80ds	-1,14±1,08cd	5,54±2,00a
2	94,11±0,38do	-2,83±0,59bcd	15,11±0,93abc	94,14±0,65 dp	-3,28±0,73bc	14,17±3,08abc
3	93,79±0,31dm	-3,27±0,97bc	17,36±0,38abcd	93,54±0,69dl	-4,14±1,14bc	17,97±3,75abcd
4	92,25±0,74cdi	-6,66±0,83b	27,12±6,50cde	86,64±2,31bc	-17,23±4,05 ^a	76,81±9,39f
5	75,28±2,95a	1,44±0,59d	30,15±2,52de	91,42±5,37cdf	-0,55±0,91bc	28,85±12,18cde
6	94,01±0,14dn	-3,32±0,19bc	15,25±0,80abc	95,32±1,00dq	-3,13±0,61bc	15,18±2,99abc
7	92,55±0,47cdj	-4,18±1,15bc	19,81±2,31abcde	92,01±1,54cdf	-5,59±1,08cd	24,46±3,96bc
8	90,77±1,54cde	-6,74±1,39b	34,15±10,42e	86,71±1,68bcd	-16,08±3,79 ^a	76,28±6,67f
9	94,19±1,63dk	-2,93±1,45cd	14,56±5,80abc	91,31±0,93b	-5,17±0,59 d	21,25±4,07bcde

Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão (n=3) de cada lote. Letras iguais para um mesmo parâmetro não diferem significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

5.3. Avaliação das condições de extração de compostos antioxidantes

Para avaliar a capacidade antioxidante de frutas e hortaliças, faz-se necessário primeiramente extrair o máximo de compostos antioxidantes. Diversos fatores como tipos de solvente (diferentes polaridades), tempo de

extração, temperatura, pH, proporção sólido-líquido e tamanho das partículas influenciam na extração (MELO, E. D. A. et al., 2008; GRUZ et al., 2013).

Neste trabalho, foi empregado planejamento fatorial 2^4 com quadruplicata no ponto central para o estudo da influência das condições de extração de compostos bioativos nas FFH SEE e LIO. As variáveis independentes avaliadas foram pH, proporção de Act:H₂O, EtOH:H₂O e tempo de agitação. Como critério de avaliação foram empregadas variáveis dependentes que foram determinação da capacidade de redução do radical DPPH, capacidade antioxidante total pelo método de FRAP, teor de FT, teor de flavonoides e teor de ácido ascórbico.

5.3.1. Determinação das condições de extração

Os efeitos das variáveis estudadas e também de suas interações podem ser melhor visualizados através do Diagrama de Pareto, no qual a linha tracejada ($P=0,5$) indica a região acima da qual os efeitos são considerados significativos. Os efeitos significativos podem ser positivos (+1) ou negativos (-1), indicando que, por exemplo quando se analisa as respostas em níveis -1 para níveis +1 há um aumento nos valores das respostas dosadas.

Na análise da extração de compostos antioxidantes pelo método de eliminação do radical DPPH para FFH SEE e LIO, pode-se comprovar que dentre as condições avaliadas, todas as variáveis foram significativas. Para FFH SEE, a variável pH mais alcalino (7,5 e 12), obteve maior efeito positivo na extração de compostos bioativos capazes de reduzir o radical DPPH, seguida pelas variáveis proporção de Act:H₂O, com tendência para maiores proporções de H₂O, tempos de extração mais curtos (0,5 h e 12,25 h) e proporção EtOH:H₂O, com maiores proporções de H₂O, como pode ser observado no diagrama de pareto (Figura 21A). Para FFH LIO, a variável Act:H₂O com tendência para maiores proporções de H₂O, mostrou maior eficiência, seguida das variáveis tempos mais prolongados (12,25 e 24h), pH mais alcalinos (7,5 e 12) e razão EtOH:H₂O, com maior proporção de EtOH (Figura 21B).

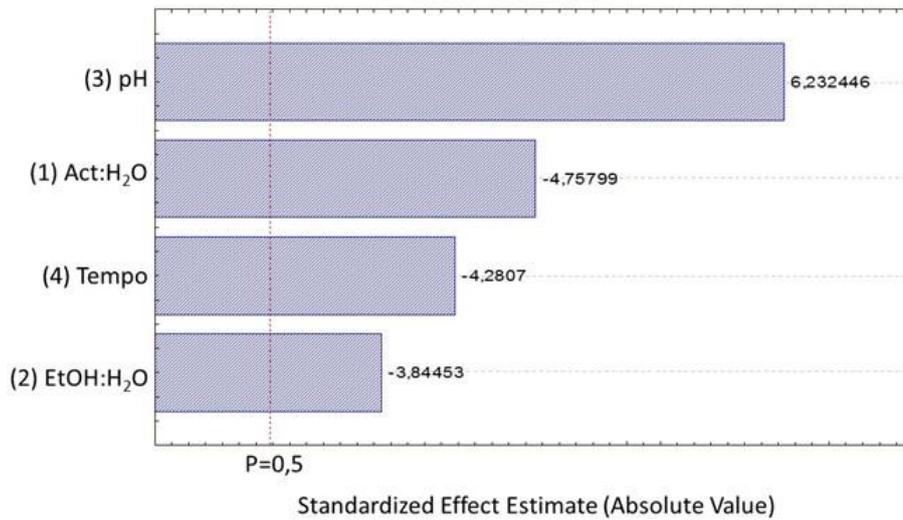
Para a atividade antioxidante pelo método de FRAP na FFH SEE, apenas a variável pH alcalino foi significativa ($p<0,5$) na extração de compostos bioativos capazes de reduzir o Fe³⁺ (Figura 22A). Na FFH LIO, a variável EtOH:H₂O, com

maior proporção de EtOH, obteve o melhor desempenho, seguida das variáveis pH mais alcalinos (7,5 a 12) e Act:H₂O, com maiores proporções de H₂O, a variável tempo não teve impacto significativo (Figura 22B).

Na avaliação do teor de FT, as FFH SEE e LIO demonstraram comportamentos semelhantes, onde todas as variáveis aplicadas foram significativas. A variável Act:H₂O, com maior proporção de H₂O, obteve rendimento superior na extração de compostos fenólicos, seguida pelas variáveis EtOH:H₂O, com maiores proporções de H₂O, pH mais ácidos (3 a 7,5), e tempos de extração mais curtos (0,5 a 12,25) (figuras 23A e B).

A

Pareto Chart of Standardized Effects; Variable DPPH-FFH SEE
2**(4-1) design; MS Pure Error=1,294762
DV: DPPH-FFH SEE



B

Pareto Chart of Standardized Effects; Variable DPPH-FFH LIO
2**(4-1) design; MS Pure Error=0,0684926
DV: DPPH-FFH LIO

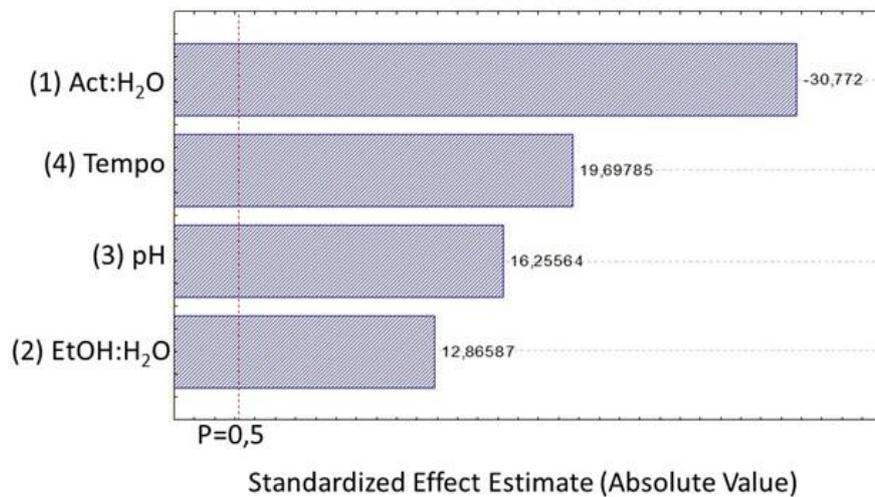


Figura 21. Diagrama de Pareto: avaliação dos efeitos das variáveis independentes investigadas na atividade antioxidante em FFH SEE (A) e LIO (B).

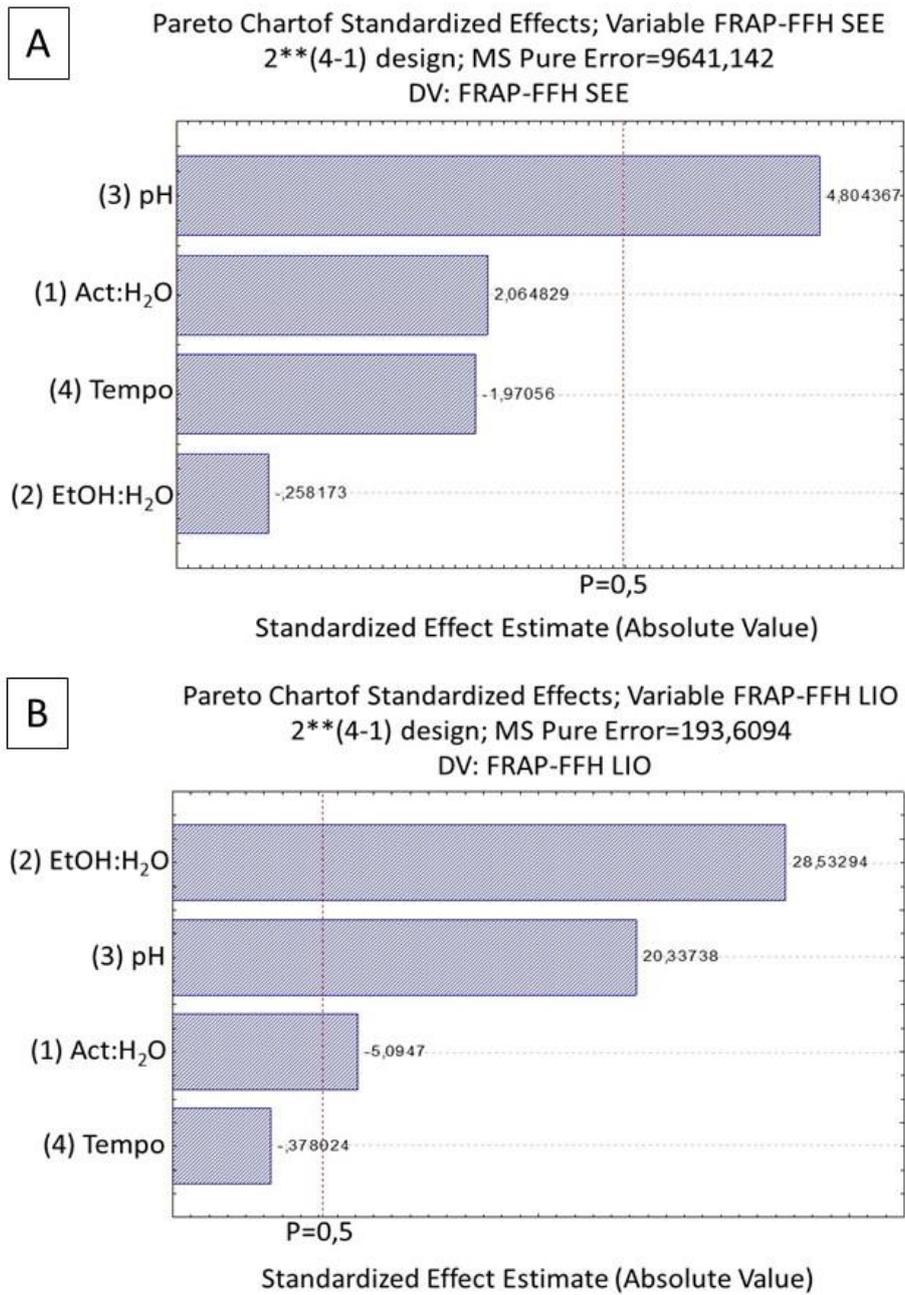


Figura 22. Diagrama de Pareto: avaliação dos efeitos das variáveis independentes investigadas na atividade antioxidante total pelo método de FRAP em FFH SEE (A) e LIO (B).

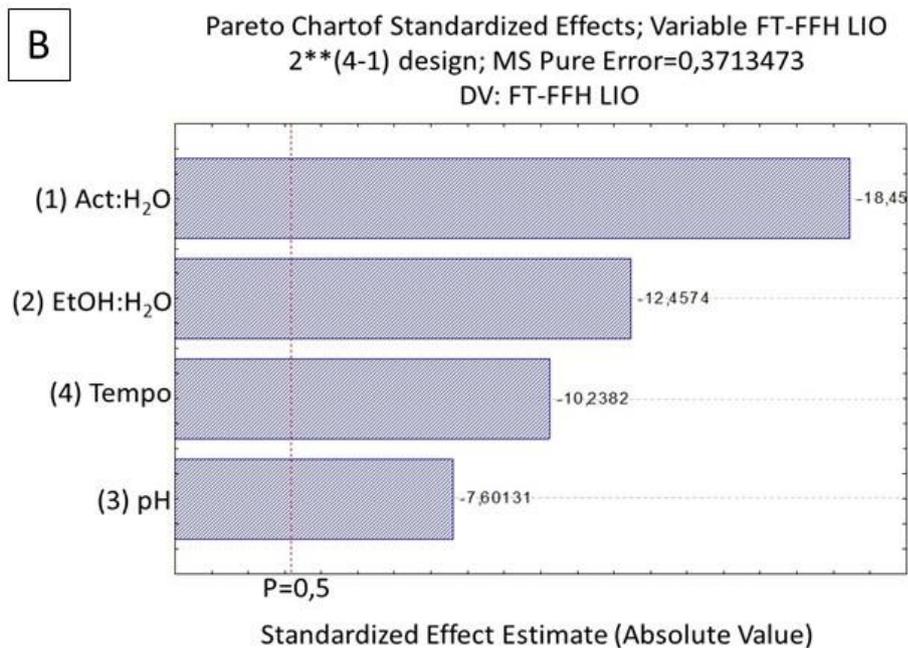
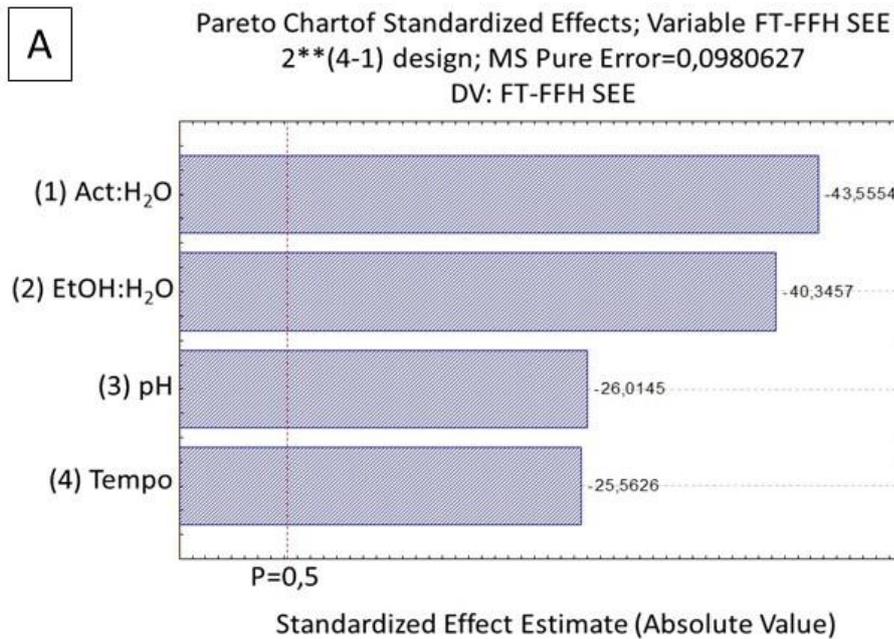


Figura 23. Diagrama de Pareto: avaliação dos efeitos das variáveis independentes no rendimento da extração de compostos fenólicos em FFH SEE (A) e LIO (B).

Na avaliação do teor de flavonoides em FFH SEE e LIO, todas as variáveis aplicadas foram significativas. Para FFH SEE, a variável com maior rendimento na extração de flavonoides foi EtOH:H₂O, com tendência para maiores proporções de H₂O, seguida pelas variáveis

Act:H₂O, com tendência para maiores proporções de H₂O, pH mais alcalinos e tempos mais curtos (Figura 24A). Para FFH LIO, a variável de maior impacto foi Act:H₂O, com tendência para maiores proporções de H₂O, tempos mais prolongados (12,25 a 24h), seguida da variável EtOH:H₂O, com tendência para maiores proporções de H₂O e pH mais ácidos (figura 24B).

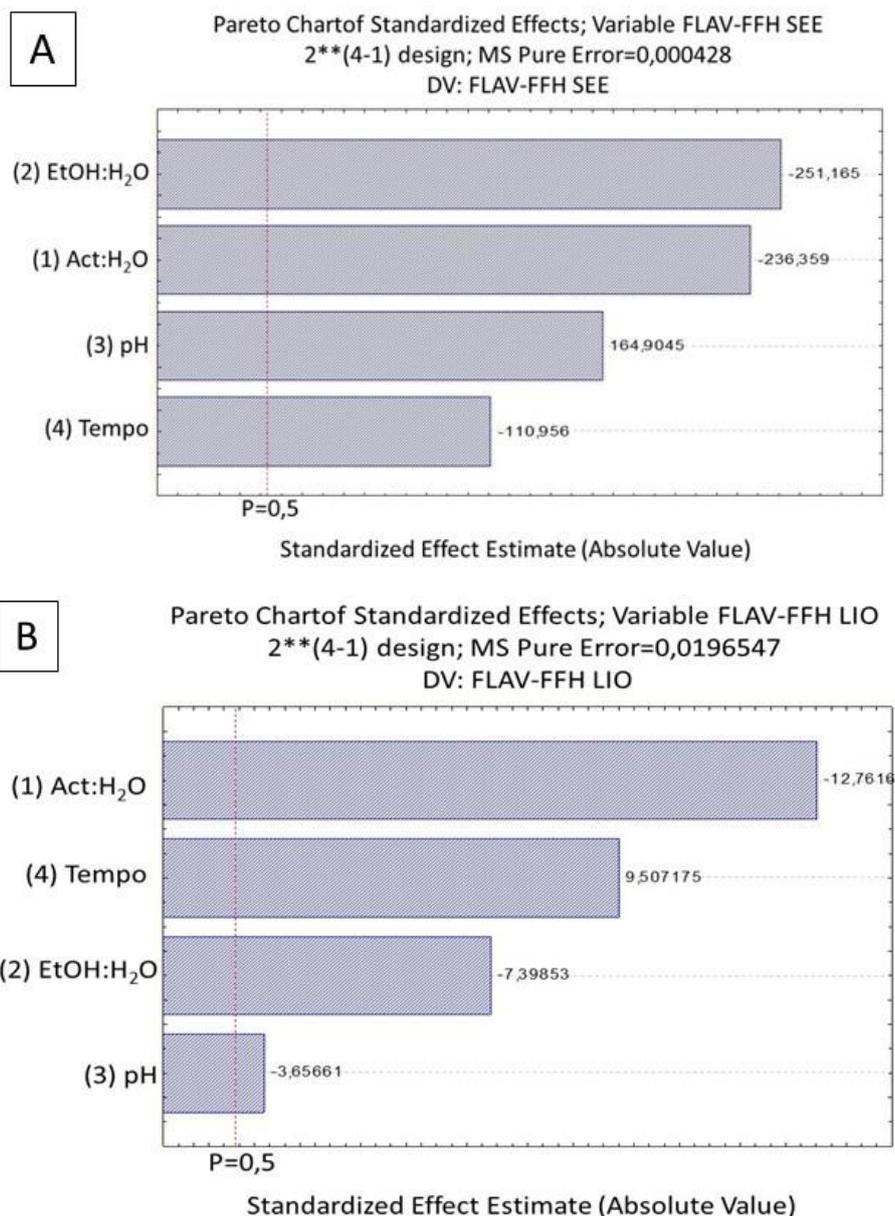


Figura 24. Diagrama de Pareto: avaliação dos efeitos das variáveis independentes no rendimento da extração de flavonoides em FFH SEE (A) e LIO (B).

De um modo geral, todas as variáveis estudadas foram significativas, com exceção para extração de compostos antioxidantes com potencial de redução do Fe^{3+} em FFH SEE, onde a única variável significativa foi valor de pH. Em relação ao nível de significância, em ambas FFH (SEE e LIO) as variáveis com maior impacto positivo na extração de compostos capazes de reduzir o Fe^{3+} e o radical DPPH, foram as que apresentaram valores de pH mais básicos (7,5 e 12). As variáveis solventes (Act:H₂O, EtOH:H₂O) aparecem como os principais fatores que afetaram a extração de compostos bioativos. A variável Act:H₂O, com maiores proporções de H₂O, apresentou um efeito positivo na extração de compostos bioativos pelo teste de DPPH, FRAP, compostos fenólicos e flavonoides. A variável tempo teve efeito menos significativo neste processo. Em suma, pode-se observar que variações na proporção de solventes hidro-cetônicos e pH básicos podem contribuir positivamente na extração de compostos bioativos, em farinha de resíduos de frutas e hortaliças seca em estufa e liofilizada.

5.3.2. AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

5.3.2.1. Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH

Os resultados do método de redução do radical DPPH foram calculados através da equação das curvas de calibração do padrão Trolox preparadas a cada dia de análise (Anexo1) e expressos em mmol de Trolox por grama de amostra seca (TEAC). Para FFH SEE, os extratos dos ensaios 1 (H₂O, pH 3, 0,5h), 6 (EtOH:H₂O, pH 3, 24h), 7 (H₂O:Act, pH 3, 24h), 8 (EtOH:Act, pH 12, 24h) e 9 (EtOH:Act:H₂O, pH 7,5, 12,25h) apresentaram capacidade antioxidante significativamente superior ($p < 0,05$), sem diferença significativa entre eles. Enquanto que para FFH LIO, os extratos dos ensaios 1 (H₂O, pH 3, 0,5h), 3 (H₂O:Act, pH pH 12, 0,5 h), 7 (H₂O:Act, pH 3, 24h) e 9 (EtOH:Act:H₂O, pH 7,5, 12,25h) foram os mais efetivos ($p < 0,05$), também sem diferença significativa entre eles (tabela 8). Considerando a média entre esses ensaios, os extratos obtidos da FFH SEE apresentaram capacidade de redução do DPPH 65% mais

elevada (média 26,19±0,76 contra 15,78±1,21 µmol Trolox/ g FFH, respectivamente para SEE e LIO).

Analisando as duas FFH juntas, observou-se que os extratos dos ensaios 1, 3, 6, 7 e 9, foram os mais efetivos, deste modo as condições favoráveis para extração de compostos antioxidantes seriam extratores hidroetanólicos e hidroacetônicos acidificados e tempo de extração prolongados (12,25 a 24h). Gruz et al., (2013) verificaram que para resíduos de vinicultura, extratos hidroetanólicos apresentaram maior capacidade antioxidante (600-2.000 µmol Trolox/100 g de amostra), quando comparados a extratos aquosos, e que o aumento gradativo da proporção de etanol, foi proporcional ao aumento da atividade antioxidante dos extratos. Extratores hidroetanólicos e hidroacetônicos são menos polares que os aquosos, mas a modificação do pH e o tempo prolongado de extração, podem aumentar o coeficiente de difusão e a solubilidade das moléculas no solvente (VIZZOTTO; PEREIRA, 2009).

Tabela 8. Atividade antioxidante pelo método de redução do radical (DPPH).

Ensaio	µmol Trolox/ g amostra seca	
	FFH SEE	FFH LIO
1	26,20±1,76 ^a	14,13±0,62 ^{abc}
2	17,70±0,36 ^b	9,57±3,93 ^{abc}
3	19,69±1,89 ^b	16,57±7,71 ^a
4	9,74±0,45 ^c	1,37±1,74 ^c
5	18,23±2,14 ^b	11,34±7,48 ^{abc}
6	27,41±1,58 ^a	7,85±2,10 ^{abc}
7	26,90±2,89 ^a	17,01±2,29 ^a
8	20,85±2,77 ^a	3,50±1,41 ^{bc}
9	29,00±3,95 ^a	15,32±2,63 ^{ab}

Os resultados são expressos como equivalentes em µmol Trolox/g FFH, com média ± desvio-padrão (n=3). Letras minúsculas iguais na mesma coluna não possuem diferença estatística. (Two-way ANOVA, Tukey, p<0,05).

Ambas FFH apresentaram elevada atividade antioxidante (1-29 µmol Trolox/g de amostra seca). Os resultados são similares a amostras liofilizadas de frutas exóticas brasileiras, que vêm sendo estudadas pelo elevado potencial

antioxidante, tais como bacuri tucumã, cupuaçu, araçá, maracujá doce, graviola, tamarindo, que apresentaram potencial de capacidade de redução do DPPH na faixa de 15 a 29 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de amostra seca (GENOVESE et al., 2008; GONÇALVES, 2008; DE SOUZA SCHMIDT GONCALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010).

No entanto, como citado anteriormente a FFH LIO foi significativamente ($p < 0,001$) inferior em média 58,22%, em todos os ensaios estudados, quando comparada a FFH SEE (Figura 25). Estes resultados são similares aos encontrados por Ahmad-Qasem et al., (2013), em bagaços de oliva, onde houve um ligeiro aumento da capacidade antioxidante, com o aumento da temperatura de secagem, em torno de 5 para 6mg Trolox/g. Alguns autores associaram tal efeito à possível formação de novos compostos fenólicos em altas temperaturas (90 a 150°C), e também ao fato da interconversão não-enzimática, que leva à disponibilização de moléculas precursoras de compostos fenólicos, que possuem elevada atividade antioxidante (QUE et al., 2008). Ahmad-Qasem et al. (2013) também verificaram que os resíduos de oliva secos a temperaturas de no máximo 70 °C, demonstraram atividade antioxidante semelhante ao do resíduo úmido.

Do mesmo modo, Garau et al., (2007) verificaram que tratamentos térmicos com temperaturas de 40 a 70°C, não favoreceram a diminuição da capacidade antioxidante de subprodutos de laranja, e que, no intuito de preservar a qualidade antioxidante do material vegetal, a temperatura de secagem deve ser controlada, uma vez que compostos bioativos podem ser degradados ou modificados, se expostos a longos períodos e/ou elevadas temperaturas de secagem.

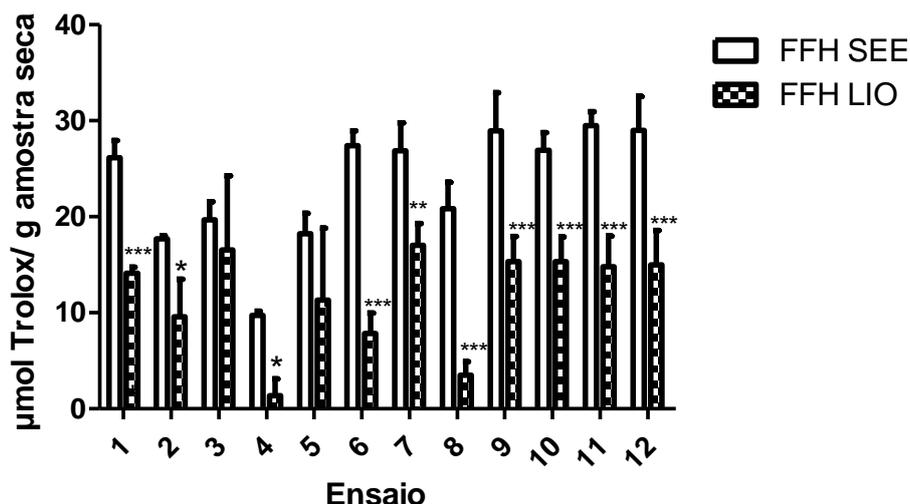


Figura 25. Atividade antioxidante total pelo método de redução do radical DPPH. Os resultados são expressos como equivalentes em $\mu\text{mol Trolox/g}$ FFH, com média \pm desvio-padrão ($n=3$). * indicam diferença estatística entre as FFH (Two-way ANOVA, Bonferroni, $***p<0,001$, $**p<0,01$, $*p<0,05$).

5.3.2.2. Determinação de fenólicos totais

O teor de FT foi calculado através da equação de uma curva de calibração do padrão de ácido gálico (Anexo 2) e expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra seca. Para as FFH SEE e LIO, o ensaio 1 (H_2O , pH 3, 0,5h) teve o maior rendimento ($p<0,05$) na extração de compostos fenólicos, quando comparado aos demais ensaios. Cabe ressaltar que, assim como para os resultados de DPPH (Tabela 9) para ambas as FFH, os extratos obtidos a partir do ensaio 4 (EtOH:Act, pH 3, 0,5h) apresentaram os piores resultados para teor de FT. Diante dos resultados, observou-se que extratos aquosos, em pH ácido e curto tempo de agitação (0,5h), possuem maior eficiência na extração de compostos fenólicos nas FFH SEE e LIO frente aos demais extratores testados. Em contrapartida, os ensaios 4 e 8 tiveram os menores rendimentos para as ambas as farinhas. Neste caso a solução extratora com razão EtOH:Act, mesmo com modificações de pH (3 e 12) e tempo (0,5 e 24) não favoreceu a extração de compostos fenólicos (tabela 9).

A maior parte dos compostos fenólicos possuem características polares, sendo, portanto, compatíveis com o extrator aquoso. O pH ácido pode também facilitar a extração de compostos fenólicos conjugados (SHELEMBE et al.,

2014), e a formação de ligações químicas entre solvente e soluto, aumentando a cinética de transferência de massa, melhorando a eficiência da extração. Compostos fenólicos são sensíveis à oxidação, sendo assim, a aplicação de tempos prolongados de extração, poderia favorecer a degradação destes compostos, reduzindo os teores nos extratos. Spigno et al. (2007) verificaram que em bagaços de uva, tempos prolongados de extração (20h), favoreciam perdas nos rendimentos de FT, e que o aumento da proporção de etanol na razão EtOH:H₂O, favoreceu a extração de compostos fenólicos não flavonoides.

Tabela 9. Teor de Fenólicos Totais nos extratos das FFH SEE e LIO.

Ensaio	mg EAG/g amostra seca	
	FFH SEE	FFH LIO
1	37,0±3,92 ^a	27,11±3,51 ^a
2	10,49±0,38 ^b	7,51±1,63 ^{cde}
3	11,53±0,98 ^b	10,37±1,02 ^{bc}
4	3,17±0,28 ^c	4,56±0,85 ^e
5	10,33±1,09 ^b	10,19±1,93 ^{bc}
6	10,72±1,00 ^b	8,92±0,96 ^{bcd}
7	11,10±2,16 ^b	11,23±0,70 ^b
8	7,00±0,96 ^{bc}	6,10±0,15 ^{de}
9	10,79±0,82 ^b	10,42±0,62 ^{bc}

Os resultados são expressos como equivalentes do padrão ácido gálico (EAG)/g amostra seca, com média ± desvio-padrão (n=3). Letras minúsculas iguais na mesma coluna não possuem diferença estatística (Two-way ANOVA, Tukey p<0,05).

Os teores de compostos fenólicos obtidos no ensaio 1 (média de 25,27 mg EAG/g amostra seca) foram similares aos encontrados em cascas de caju amarelo e vermelho (MOO-HUCHIN et al., 2015), em caroços de jaca (27,7 ± 3,4mg EAG/g amostra) (SOONG; BARLOW, 2004) e em frutas tropicais brasileiras como acerola (10,280 ± 77.7) e camu-camu (11,615 ± 384) (Rufino et al. (2010)). Estes resultados sugerem que resíduos agroindustriais, mesmo após

processos de secagem, são capazes de preservar quantidades significativas compostos fenólicos.

Não houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre as duas farinhas (SEE e LIO) em todos os ensaios estudados, com exceção do ensaio 1, onde FFH LIO teve resultados inferiores em média 27,02% (Figura 26). Elevados teores de compostos fenólicos ($1,88 \pm 0,06$ a $20,94 \pm 0,46$ mg EAG/g) também foram encontrados em resíduos agroindustriais de frutas (MELO, P. S. et al., 2011), corroborando os resultados do presente estudo. Extratos metanólicos de farinhas de resíduos de acerola, maracujá e abacaxi mostraram elevados teores de compostos fenólicos variando de 9 a 94 mg EAG/g de extrato seco (DE OLIVEIRA et al., 2009).

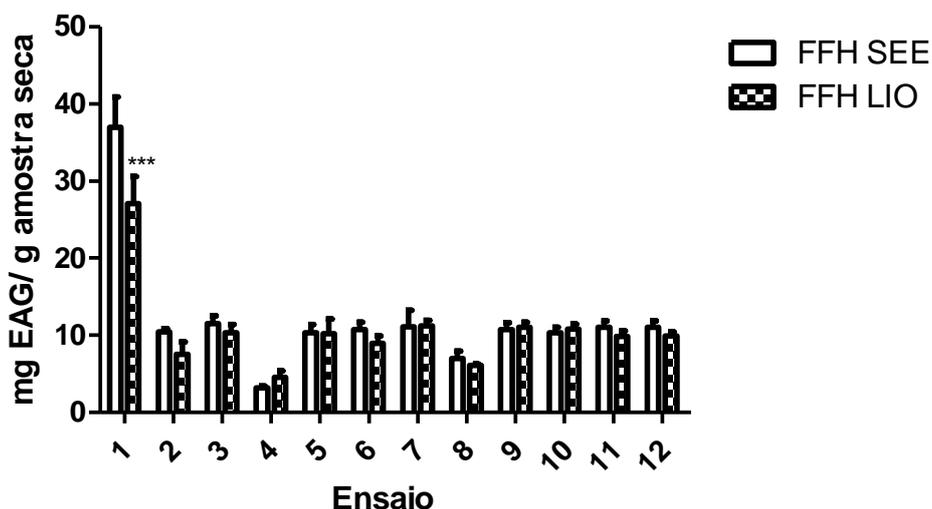


Figura 26. Teor de Fenólicos Totais nos extratos das FFH SEE e LIO. Os resultados são expressos como mg de equivalentes do padrão ácido gálico (EAG)/g amostra seca, com média \pm desvio-padrão ($n=3$). * indicam diferença estatística (Two-way ANOVA, Bonferroni, $p < 0,001$).

5.3.2.3. Atividade antioxidante total pelo método de FRAP

A atividade antioxidante pelo método de redução FRAP foi calculada através da equação de uma curva de calibração do padrão de sulfato ferroso (Fe^{2+}) (anexo 3) e os resultados expressos em mmol de Fe^{2+} por grama de amostra seca. Para FFH SEE os extratos do ensaio 6 (EtOH:H₂O, pH 3, 24h) apresentaram capacidade antioxidante significativamente superior ($p < 0,05$), seguidos do ensaio 7 (H₂O:Act, pH 3, 24h) e 9 (EtOH:Act:H₂O, pH 7,5, 12,25h)

(Tabela 10). Para FFH LIO, os extratos dos ensaios 7 (H₂O:Act, pH 3, 24h), 9 (EtOH:Act:H₂O, pH 7,5, 12,25h) e 3 (H₂O:Act, pH 12, 0,5 h) apresentaram os melhores resultados. Observou-se para ambas FFH, que a mistura de solventes, seja Act:H₂O, EtOH:H₂O ou ainda ETOH:Act:H₂O em pH ácido (3,0) e tempo prolongado de extração (24h), foram os mais efetivos para o método de FRAP. Em contrapartida, extratores aquosos mesmo com modificações de pH (3 a 12) e tempo de extração (0,5 a 24 h), tiveram baixa efetividade.

Tabela 10. Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (Fe⁺³) (FRAP).

Ensaio	mmol Fe ⁺² /g de amostra seca	
	FFH SEE	FFH LIO
1	71,86±8,46 ^{ab}	79,83±11,08 ^a
2	105,44±1,43 ^{bc}	135,72±27,31 ^{abc}
3	109,55±11,58 ^{cd}	166,62±30,29 ^{bc}
4	68,20±1,83 ^a	99,82±21,67 ^a
5	75,34±5,32 ^a	96,39±22,64 ^a
6	172,72±13,28 ^e	153,94±31,82 ^{abc}
7	136,35±15,86 ^d	189,19±14,42 ^c
8	104,08±14,91 ^{bc}	122,59±12,70 ^{ab}
9	122,16±1,34 ^{cd}	183,56±19,58 ^{bc}

Os resultados são expressos como mmol de equivalentes de Fe⁺²/g, com média ± desvio-padrão (n=3). Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si (Two-way ANOVA, Tukey, p<0,05).

As duas FFH apresentaram elevada atividade antioxidante pelo método FRAP (variando de 68 a 189 mmol de Fe⁺²/g), no entanto, a FFH LIO foi significativamente superior (p<0,001) nos extratos dos ensaios 3 (H₂O:Act, pH

pH 12, 0,5h), 7 (H₂O:Act, pH 3, 24h) e 9 (EtOH:Act:H₂O, pH 7,5, 12,25h) (Figura 27).

Estudos prévios avaliaram o potencial de resíduos de frutas como fontes de compostos bioativos. As cascas de mirtilo, manga e pinha e sementes de uvas apresentaram elevados valores de FRAP variando de 96,17 a 181,39 $\mu\text{mol g de Fe}^{+2}$ por grama de amostra fresca (DENG et al., 2012), ainda resíduos de carambola apresentaram valores médios de 510 $\mu\text{mol g de Fe}^{+2}$ por grama de amostra seca (SHUI; LEONG, 2006).

A capacidade antioxidante dos extratos determinada pelo método de FRAP é baseada na habilidade destes compostos de reduzirem o íon férrico a ferroso, envolvendo mecanismo de transferência de elétron, assim como acontece do método do DPPH e Folin-Ciocalteu. Os antioxidantes detectados por FRAP limitam-se aos solúveis em água ou em soluções aquosas de etanol, compostos hidrofóbicos como carotenoides não apresentam capacidade redutora do íon férrico.

Contrariamente ao esperado, extratos aquosos apresentaram menores valores de redução do FRAP ($p < 0,05$). No entanto, corroborando o apresentado acima, os extratos EtOH:Act apresentaram os valores mais baixos para FRAP ($p < 0,05$), enquanto que extratos aquosos de etanol e acetona foram os mais eficazes ($p < 0,05$). Do mesmo modo, os melhores resultados para FFH LIO podem ser explicados pela maior conservação de compostos solúveis em água, enquanto que durante a secagem em estufa, ocorre uma arraste destes compostos para a superfície, o que pode ter facilitado a perda por volatilização de boa parte destes compostos, como ácidos orgânicos de ação quelante, notadamente ácido cítrico.

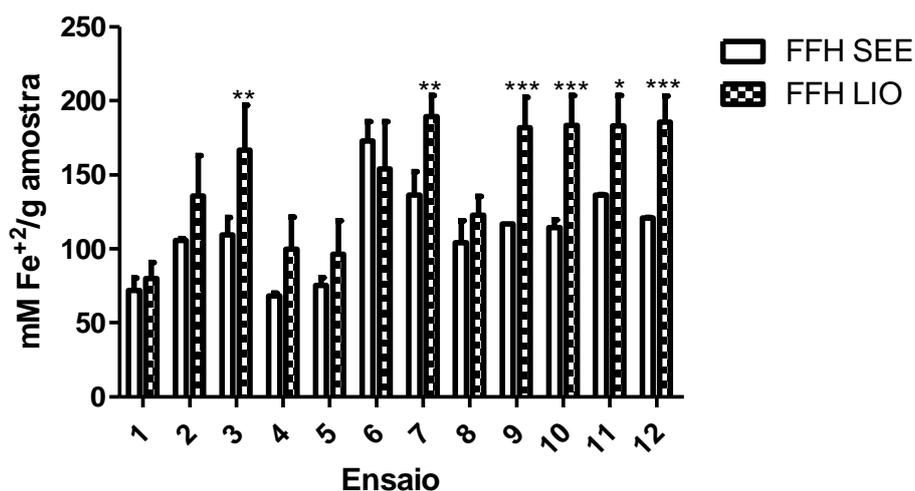


Figura 27. Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (Fe^{+3}) (FRAP). Os resultados são expressos como mmol de equivalentes de Fe^{+2}/g , com média \pm desvio-padrão ($n=3$). * indicam diferença estatística (Two-way ANOVA, Bonferroni, *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$).

5.3.2.4. Determinação de flavonoides

O teor de flavonoides, foi calculado através da equação de uma curva de calibração de quercetina (anexo 4), e expressos em mg de equivalentes de quercetina por grama de amostra seca. Para os ensaios 4 e 8, não foi possível determinar o valor de flavonoides, devido a interferências espectrofotométricas, que inviabilizaram as leituras.

Em geral, para as duas FFH, os ensaios 7 ($\text{H}_2\text{O}:\text{Act}$, pH 3, 24h) e 9 ($\text{EtOH}:\text{Act}:\text{H}_2\text{O}$, pH 7,5, 12,25h) tiveram o maior rendimento ($p<0,05$) na extração de flavonoides, e os extratos aquosos, ensaios 1 (H_2O , pH 3, 0,5h) e 5 (H_2O , pH 12, 24h) tiveram os menores ($p<0,05$) rendimentos (tabela 11). Os resultados estão de acordo com os encontrados por Wolfe & Liu, (2003), que verificaram que extratos hidroacetônicos e hidroetánolicos mostraram elevado rendimento na extração de flavonoides em cascas de maçãs secas por ar quente e liofilização.

Esta característica pode ser relacionada com a menor polaridade dos flavonoides, quando comparados aos demais compostos fenólicos, o que possibilita uma maior afinidade com o soluto, aumentando a transferência de massa e rendimento da extração. Neste mesmo sentido, os extratores aquosos, mesmo com modificações de valores de pH e de tempo não favoreceram a extração de flavonoides.

Os teores de flavonoides encontrados no presente estudo, aproximam-se aos teores de flavonoides totais de frutas exóticas brasileiras consideradas potentes antioxidantes, tais como camu-camu, maná-cubiu e carambola (3,52; 2,39 e 0,59 mg por grama de amostra seca) (GONÇALVES, 2008).

Tabela 11. Teor de flavonoides nos extratos de FFH SEE e LIO.

Ensaio	mg de Eq. de quercetina/g de amostra seca	
	FFH SEE	FFH LIO
1	2,01±0,05 ^a	1,42±0,02 ^a
2	4,00±0,05 ^d	6,61±0,09 ^f
3	3,52±0,05 ^c	5,55±0,07 ^d
4	n.d.	n.d.
5	2,51±0,10 ^b	2,58±0,03 ^b
6	4,87±0,08 ^f	3,71±0,05 ^c
7	5,21±0,07 ^g	5,84±0,08 ^e
8	n.d.	n.d.
9	4,53±0,02 ^e	5,42±0,14 ^d

Os resultados são expressos como mg de equivalentes do padrão de quercetina/g com média ± desvio-padrão (n=3). Letras minúsculas na mesma coluna não possuem diferença estatística (Two-way ANOVA, Tukey, p<0,001). n.d., não detectado.

Em relação ao teor de flavonoides entre as duas FFH, não houve diferença nos extratos do ensaio 5. No entanto, a FFH LIO nos ensaios 2, 3 e 9 teve rendimento significativamente (p<0,001) superior em média 31,41%, e nos extratos dos ensaios 1 e 6 o maior rendimento foi atribuído a FFH SEE (Figura 28). Corroborando os resultados, Wolfe & Liu, (2003) verificaram que não houve diferença significativa no teor de flavonoides em cascas de maçã secas por ar quente e liofilização. Os autores também verificaram que ambos os processos de secagem não favoreceram perdas de flavonoides, visto que os teores de flavonoides nas amostras secas eram semelhantes ao das amostras frescas.

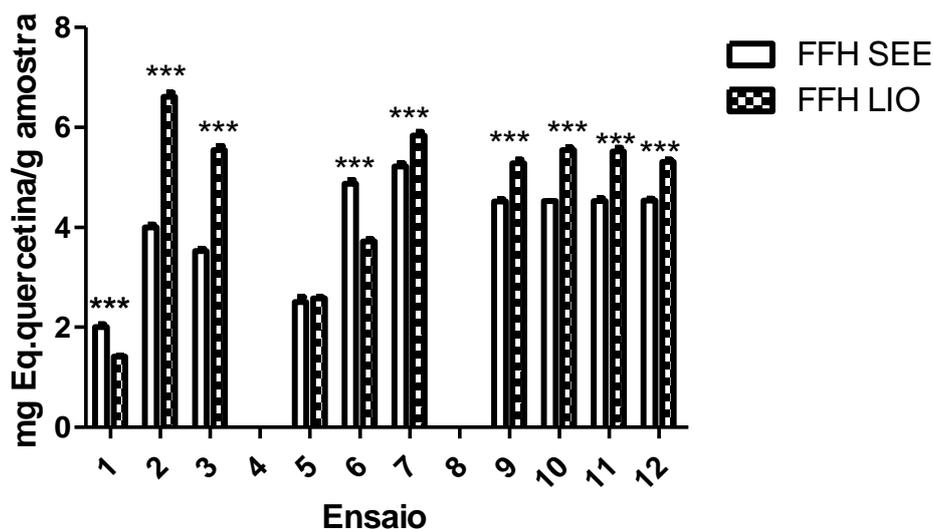


Figura 28. Teor de flavonoides nos extratos de FFH SEE e LIO. Os resultados são expressos como mg de equivalentes do padrão quercetina/g com média \pm desvio-padrão (n=3). * indicam diferença estatística (Two-way ANOVA, Bonferroni, ***p<0,001).

5.3.2.5. Determinação de ácido ascórbico

Alguns métodos clássicos de determinação de compostos antioxidantes, notadamente o método de Folin-Ciocalteu podem sofrer interferências de outros compostos não fenólicos de ação redutora, tais como alguns açúcares, carotenoides e principalmente do ácido ascórbico, o que pode levar a resultados superestimados de FT (GEORGÉ, STEPHANE et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009). Alguns autores sugerem um passo adicional na análise de FT, por meio da quantificação de ácido ascórbico ou sua destruição por calor ou condições ácidas (VINSON et al., 2001). Neste sentido, determinou-se o teor de ácido ascórbico para avaliar possíveis interferências nas condições de extração estudadas.

Todos os ensaios apresentaram baixo teor de ácido ascórbico (entre $0,029 \pm 0,003$ a $0,099 \pm 0,004$ mg/100 g de FFH). Apesar dos baixos valores encontrados, observou-se uma melhor conservação de ácido ascórbico em média 35,12% (ensaios 3, 4 e 7) ($p < 0,05$). (Tabela 12 e figura 29).

Contreras-Calderón et al (2011) investigaram o conteúdo de ácido ascórbico em polpa, cascas e sementes de 24 frutas exóticas colombianas e encontraram elevados teores nas polpas, enquanto que nas cascas e sementes os teores foram reduzidos em torno de 80%. Este fenômeno pode ser atribuído

à elevada solubilidade do ácido ascórbico, que se perde por lixiviação no processo de retirada das polpas. Os menores teores de ácido ascórbico em FFH SEE, podem estar relacionados a extrema sensibilidade deste composto a processos oxidativos, que podem ser iniciados durante o processo de secagem, pela exposição a temperaturas elevadas.

Tabela 12. Teor de ácido ascórbico nos ensaios de FHH SEE e LIO.

Ensaio	mg de ácido ascórbico/100g amostra seca	
	FFH SEE	FFH LIO
1	0,044±0,004 ^{ab}	0,029±0,003 ^{ab}
2	0,041±0,003 ^a	0,039±0,001 ^a
3	0,040±0,000 ^a	0,059±0,024 ^a
4	0,053±0,003 ^a	0,089±0,003 ^b
5	0,048±0,004 ^{ab}	0,042±0,002 ^{ab}
6	0,041±0,002 ^a	0,055±0,005 ^a
7	0,045±0,002 ^{ab}	0,064±0,001 ^{ab}
8	0,080±0,003 ^c	0,099±0,004 ^c
9	0,041±0,005 ^a	0,050±0,002 ^a

Os resultados são expressos como mg de ácido ascórbico/100 g, com média ± desvio-padrão (n=3). Letras minúsculas iguais na mesma coluna não possuem diferença estatística (Two-way ANOVA, Tukey, p<0,05).

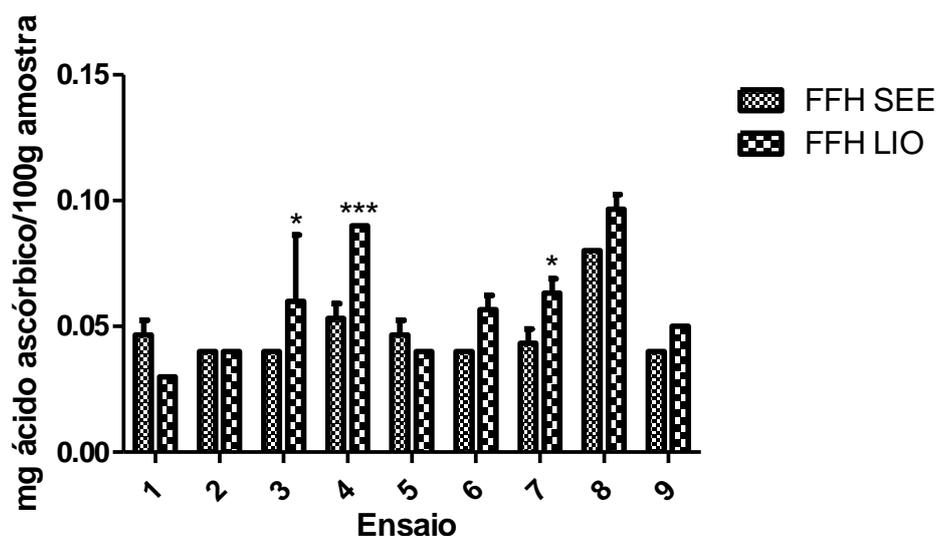


Figura 29. Teor de ácido ascórbico nos extratos de FFH SEE e LIO. Os resultados são expressos como mg de ácido ascórbico/100 g, com média \pm desvio-padrão (n=3). * indicam diferença estatística (Two-way ANOVA, Bonferroni, ***p<0,001, *p<0,05).

Assume-se que o processo de liofilização não afeta a composição do material vegetal, no entanto, poucos dados experimentais estão disponíveis para confirmar esta hipótese (GEORGÉ, STÉPHANE et al., 2011). Hossain et al. (2010) mostraram que o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante avaliada por FRAP aumentaram quando amostras frescas de alecrim, manjerona e manjeriço foram secas (a vácuo ou por circulação de ar). Os autores sugerem que a secagem torna os tecidos vegetais mais quebradiços, causando uma ruptura das paredes celulares durante as etapas de trituração e homogeneização, por conseguinte, haverá uma maior liberação de compostos antioxidantes para a solução de extração. Além disso, amostras frescas podem sofrer uma degradação de compostos antioxidantes devido à ação enzimática, uma vez que as enzimas ainda se encontram ativas.

5.3.3.6. Correlação entre as variáveis dependentes

Estudos prévios apontam correlações lineares entre os resultados de testes baseados em transferência de elétron tais como FRAP, DPPH e FT (HUANG, D.; OU; PRIOR, 2005). No entanto, não há um consenso na literatura

da existência de correlações lineares entre os métodos de determinação da capacidade antioxidante. Os potenciais redox e a dependência das condições utilizadas como solventes e pH podem ser bastante diferentes entre um teste e outro, resultando em diferentes valores de compostos antioxidantes em alimentos, portanto, é recomendado a avaliação de correlações para melhor compreender o potencial de capacidade antioxidante de amostras complexas (APAK et al., 2007).

Para os testes de correlação linear entre as variáveis estudadas neste trabalho, não foram considerados os valores dos ensaios 1 e 5, que compreendem extratores aquosos com valores de pH e tempos diferenciados. Em avaliação prévia, notou-se que ao considerar estes extratos os valores dos coeficientes de correlação eram reduzidos drasticamente em todos os testes. A exceção deu-se somente para o teste de flavonoides, onde como houve ausência dos resultados para os ensaios 4 e 8 que compreendem extratores etanólico-cetônicos.

Análises de regressão linear não demonstraram correlação positiva entre teores de FT e ácido ascórbico para FFH SEE ($R^2=0,3380$, $p=0,17$) e LIO ($R^2=0,4278$, $p=0,11$) (figuras 30A e B), indicando que não houve interferência do ácido ascórbico. Para os teores de FT e flavonoides, os resultados mostraram uma leve correlação positiva, mas não significativa nos extratos de FFH SEE ($R^2=0,6202$, $p=0,11$) e LIO ($R^2=0,4958$, $p=0,11$) (figura 31A e B). Nesse caso, pode-se dizer que o conteúdo fenólico determinado, em grande parte é composto por compostos fenólicos não flavonoides, que possuem características mais polares.

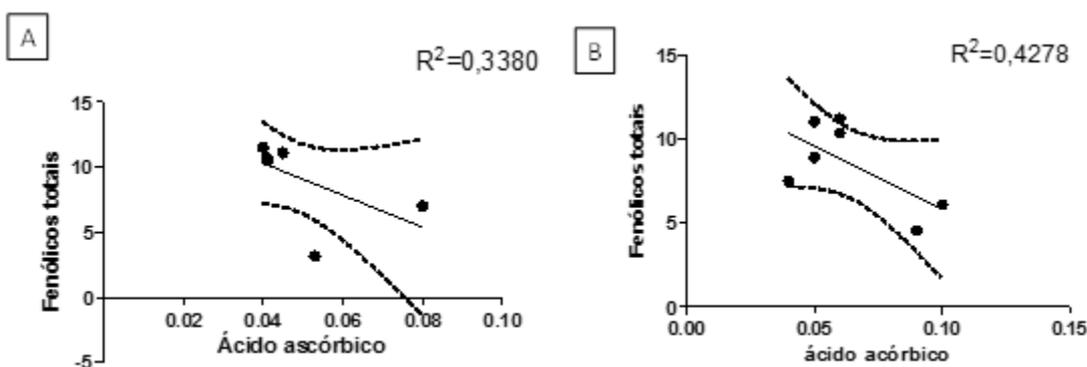


Figura 30. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre teor de fenólicos totais (expresso em mg EAG/g amostra seca) e teor ácido ascórbico (expresso em mg ácido ascórbico/100g de amostra seca) em FFH SEE (A) e FFH LIO (B). Os valores são expressos como média de 4 valores em triplicatas, para cada ensaio. Intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

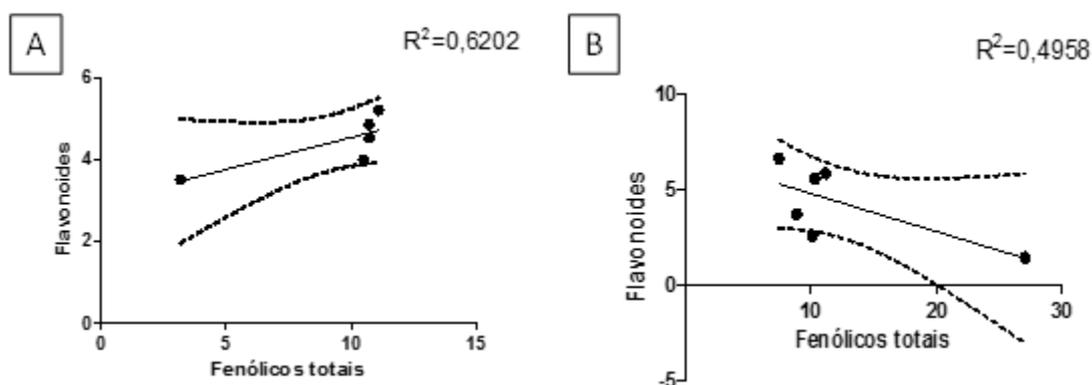


Figura 31. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre teor de fenólicos totais (expresso em mg EAG/g amostra seca) e teor de flavonoides (expresso em mg Eq. quercetina /g de amostra seca) em FFH SEE (A) e FFH LIO (B). Os valores são expressos como média de 4 valores em triplicatas, para cada ensaio. Intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

O teste de redução do radical DPPH, não demonstrou correlação positiva com teores de ácido ascórbico para FFH SEE ($R^2 = 0,0635$, $p = 0,58$) e LIO ($R^2 = 0,4164$, $p = 0,11$) (Figura 33 A e B). Para os teores de FT em FFH SEE houve uma correlação positiva mas não significativa ($R^2 = 0,5637$, $p = 0,05$) (figura 32 A), no entanto em FFH LIO houve forte correlação positiva ($R^2 = 0,9171$, $p = 0,0007$) (Figura 32 B). Estes resultados são compatíveis com diversos artigos apresentados na literatura, onde o ácido ascórbico apresenta menor influência no potencial antioxidante no método do DPPH, que os teores de compostos fenólicos (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1999; PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000; SÁNCHEZ-MORENO; JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA-CALIXTO, 2000; JIMÉNEZ-ESCRIG et al., 2001; MELO, P. S. et al., 2011). O coeficiente de correlação relatado entre DPPH e ácido ascórbico para resíduos e polpas de frutas tropicais diversas como carambola, goiaba, papaia e

manga foi de $R^2=0,20$, enquanto o coeficiente de correlação para DPPH e FT de frutas tropicais brasileiras foram de $R^2=0,97$ (INFANTE et al., 2013).

Devido a não aplicação de calor na FFH LIO, houve uma maior preservação de compostos fenólicos, já que estes compostos são suscetíveis à oxidação em altas temperaturas (GOMES; CAPONIO, 2001). Em FFH SEE, que no teste de DPPH teve atividade antioxidante superior à de FFH LIO, para todos os ensaios testados, pode estar relacionada a outros compostos antioxidantes não fenólicos, como carotenoides, polímeros bioativos e produtos da reação de Maillard (KROKIDA; TSAMI; MAROULIS, 1998; YILMAZ; TOLEDO, 2005).

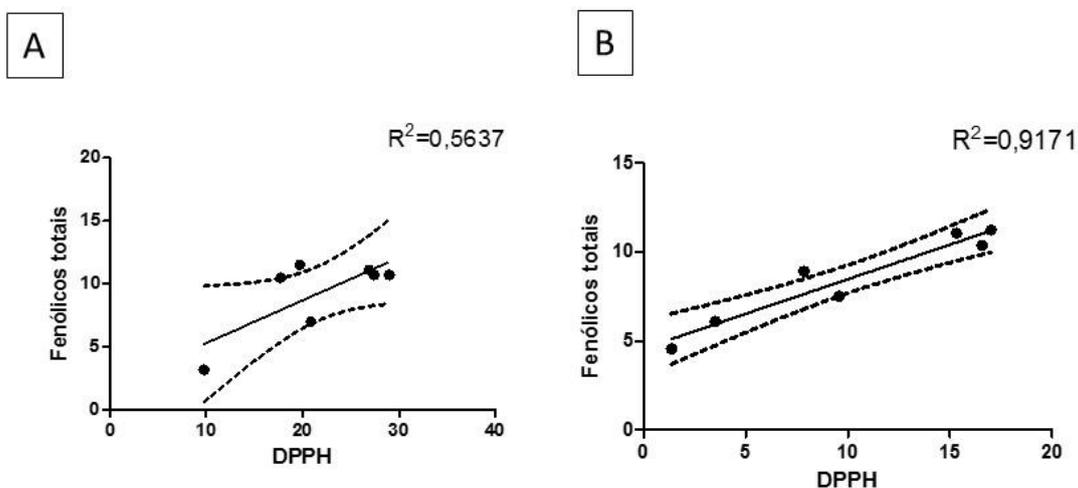


Figura 32. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre atividade antioxidante (DPPH, expresso em $\mu\text{mol Trolox/g}$ amostra seca) e teor de fenólicos totais (expresso em mg EAG/g de amostra seca) em FFH SEE (A) e FFH LIO (B). Os valores são expressos como média de 4 valores em triplicatas, para cada ensaio. Intervalo de confiança de 95% ($p<0,05$).

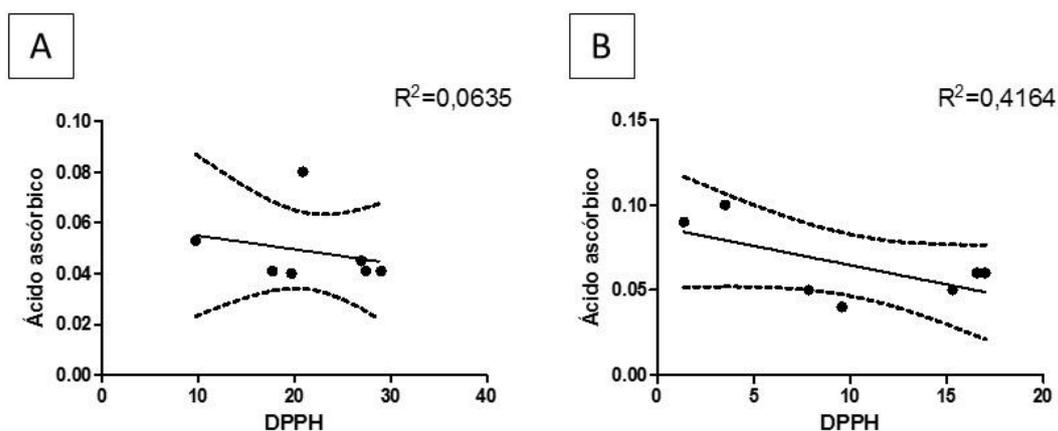


Figura 33. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre atividade antioxidante (DPPH, expresso em $\mu\text{mol Trolox/g}$ amostra seca) e teor de fenólicos totais (expresso em mg EAG/g de amostra seca) em FFH SEE (A) e FFH LIO (B). Os valores são expressos como média de 4 valores em triplicatas, para cada ensaio. Intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

No teste FRAP, a redução dos íons férricos pode ser influenciada por ácidos orgânicos, como ascórbico, cítrico, láctico e málico, componentes presentes principalmente em frutas e hortaliças, como também sofre interferência de compostos fenólicos, flavonoides e não flavonoides. O teste de FRAP não apresentou correlação positiva com os teores de ácido ascórbico em FFH SEE ($R^2=0,1267$, $p=0,4332$) e FFH LIO ($R^2=0,3809$, $p=0,1398$) (figura 34A e B). Houve uma leve correlação positiva com os teores de FT em FFH SEE ($R^2=0,4992$, $p=0,07$), enquanto que para FFH LIO houve forte correlação positiva ($R^2=0,9866$, $p=0,0001$) (Figura 35A e B). O teste FRAP também demonstrou correlação positiva quanto aos teores de flavonoides para FFH SEE ($R^2=0,7946$, $p=0,03$) e FFH LIO ($R^2=0,6298$, $p=0,03$) (Figura 36A e B). Este resultado sugere que os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides possuem ação redutora do íon férrico. De fato, estes últimos possuem também ação quelante devido à sua estrutura ortodihidroxifenólica (GONZALO; ALONSO, 2002).

Os resultados estão de acordo com os encontrados por Santos et al. (2014), que verificaram uma correlação positiva entre teor de FT ($R^2=0,8901$) e flavonoides ($R^2=0,9809$) com o teste FRAP, em cascas de maracujá liofilizadas. Resíduos de um modo geral possuem baixo teor de ácidos orgânicos, deste

modo as classes de compostos fenólicos apresentam uma contribuição importante para atividade antioxidante por FRAP (Santos et. al., 2014).

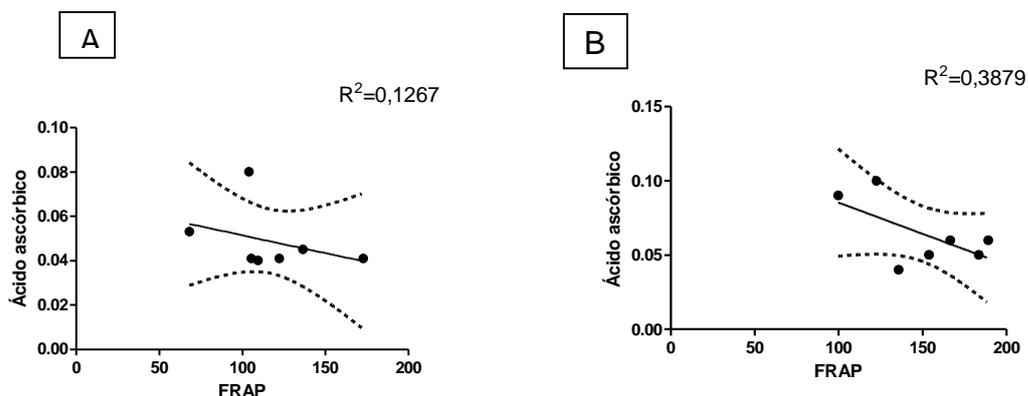


Figura 34. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre atividade antioxidante (FRAP, expresso em mmol de Fe^{+2}) e teor de ácido ascórbico (expresso em mg ácido ascórbico/100g de amostra seca) em FFH SEE (A) e FFH LIO (B). Os valores são expressos como média de 4 valores em triplicatas, para cada ensaio. Intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

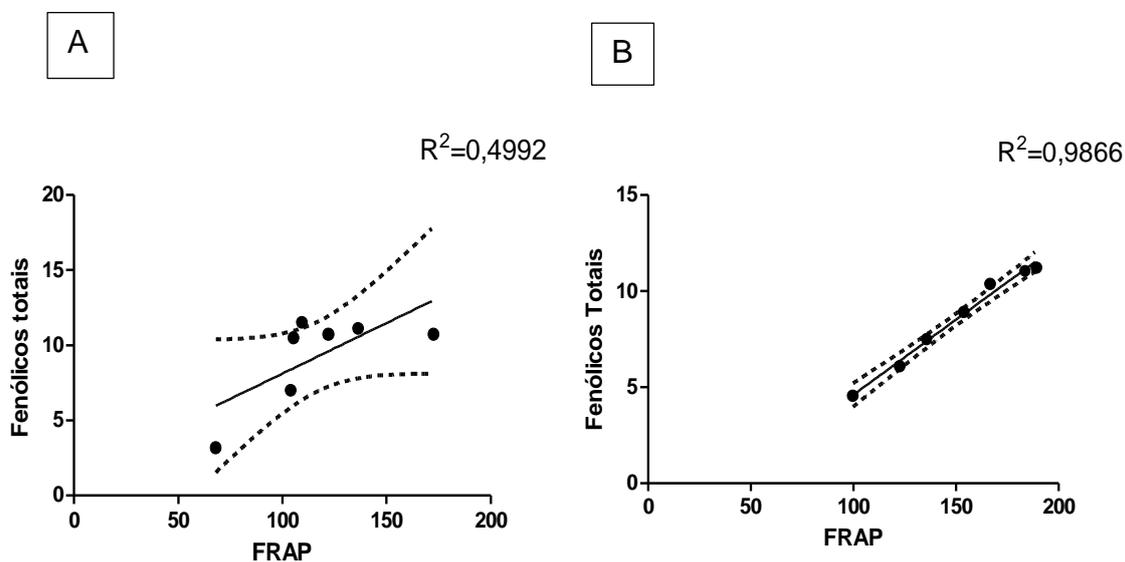


Figura 35. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre atividade antioxidante (FRAP, expresso em mmol de Fe^{+2}) e teor de fenólicos totais (expresso em mg EAG /g de amostra seca) em FFH SEE (A) e FFH LIO (B). Os valores são expressos como média de 4 valores em triplicatas, para cada ensaio. Intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

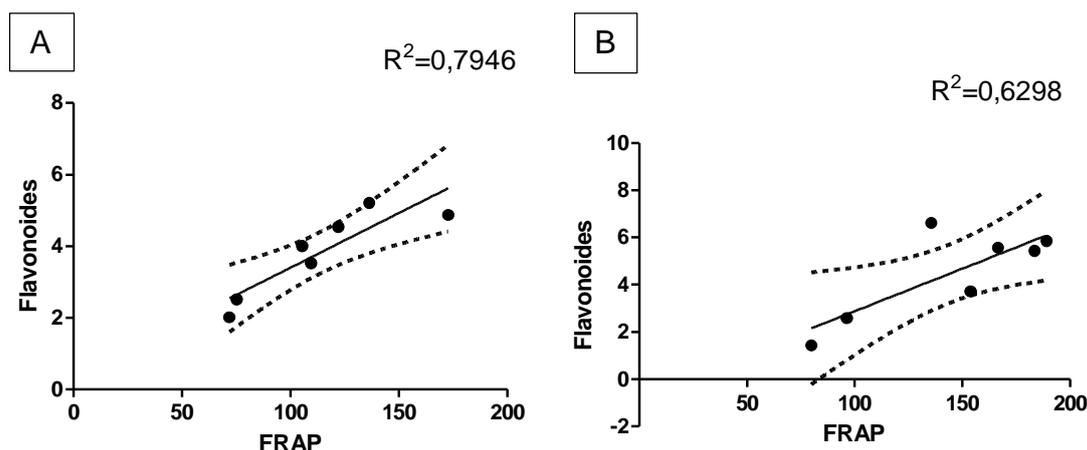


Figura 36. Coeficiente de correlação por teste paramétrico de regressão linear, entre atividade antioxidante (FRAP, expresso em mmol de Fe²⁺) e teor de flavonoides (expresso em mg Eq. quercetina /g de amostra seca) em FFH SEE (A) e FFH LIO (B). Os valores são expressos como média de 4 valores em triplicatas, para cada ensaio. Intervalo de confiança de 95% ($p<0,05$).

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, farinha de frutas e hortaliças (FFH) obtidas por secagem em estufa (SEE) e liofilização (LIO) foram caracterizadas fisico-quimicamente por MEV, colorimetria e capacidade antioxidante. A capacidade antioxidante dos extratos obtidos a partir de diferentes condições de extração (proporção de solvente, pH e tempo de agitação) das FFH SEE e LIO foi analisada por diferentes métodos (DPPH, Fenólicos Totais, FRAP, Flavonoides e Ácido Ascórbico).

Todas as variáveis estudadas nas condições de extração de compostos antioxidantes foram significativas. Pode-se concluir que, dentre as 9 condições de extração testadas, sendo que quatro delas foram repetições do ponto central, quatro ensaios destacaram-se por apresentar extratos com elevada capacidade antioxidante com base nos resultados dos diversos métodos testados (DPPH, FRAP, Fenólicos Totais e Flavonoides). Assim, destacaram-se as condições de extração obtidas nos ensaios 3 (H₂O:Act, pH 12, 0,5h), 6 (EtOH:H₂O, pH 3, 24h), 7 (H₂O:Act, pH 3, 24h) e 9 (EtOH:Act:H₂O, pH 7,5, 12,25h).

De um modo geral, a mistura de solventes Act:H₂O e EtOH:H₂O e EtOH:Act:H₂O apresentaram melhores rendimentos na extração dos compostos

bioativos quando comparadas com as variações EtOH:Act, que em todas as condições testadas demonstraram os menores rendimentos, independente de variação no pH e tempos de extração. Isto se deve ao fato da mistura de solventes ter promovido uma maior eficiência na extração de compostos antioxidantes de diferentes polaridades.

Globalmente, quando se aplicou pH alcalino, tempos mais curtos foram suficientes (ensaio 3), minimizando a possibilidade de reações de degradação dos compostos bioativos. Enquanto que o pH ácido promoveu bons resultados mas necessitou de maiores tempos de extração (ensaios 6 e 7). Neste contexto, as condições estudadas no ponto central foram muito eficientes, na medida em que contemplaram todos os requisitos considerados significativos (positivos) na extração de compostos antioxidantes de FFH: mistura de solventes, pH e tempo de agitação intermediários.

Em relação aos métodos de secagem estudados, pode-se concluir que a FFH LIO demonstrou maior correlação positiva entre métodos analisados, como também demonstrou uma menor modificação da matriz com maior preservação de diferentes estruturas de compostos bioativos. No entanto, a FFH SEE por ser mais acessível e menos dispendiosa, pode ser utilizada como método preferencial de secagem de resíduos de frutas e hortaliças, uma vez que também demonstrou elevada capacidade antioxidante, e uma conformação estrutural que favoreceu a disponibilização de compostos bioativos para extração.

Como perspectivas do presente trabalho, análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC- QTOF MS) estão em andamento para identificar e quantificar os compostos bioativos presentes nos extratos que obtiveram os melhores resultados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R.; DUARTE, S. D. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 34, n. 2, p. 414-420, 2010.

AHMAD-QASEM, M. H.; BARRAJON-CATALAN, E.; MICOL, V.; CÁRCEL, J. A.; GARCIA-PEREZ, J. V. Influence of air temperature on drying kinetics and antioxidant potential of olive pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 3, p. 516-524, 2013.

ALASALVAR, C.; GRIGOR, J. M.; ZHANG, D.; QUANTICK, P. C.; SHAHIDI, F. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1410-1416, 2001.

ALBUQUERQUE, T. G.; SANTOS, F.; SANCHES-SILVA, A.; OLIVEIRA, M. B.; BENTO, A. C.; COSTA, H. S. Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. **Food Chemistry**, v., n., p., 2014.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p., 2006.

APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ÇELİK, S. E.; BEKTAŞOĞLU, B.; BERKER, K. I.; ÖZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1496-1547, 2007.

ARDESTANI, A.; YAZDANPARAST, R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 21-29, 2007.

ARMENTEROS, M.; MORCUENDE, D.; VENTANAS, S.; ESTÉVEZ, M. Application of natural antioxidants from strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) and dog rose (*Rosa canina* L.) to frankfurters subjected to refrigerated storage. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 12, n. 11, p. 1972-1981, 2013.

ARMSTRONG, G. A.; HEARST, J. E. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 2, p. 228-237, 1996.

ASCHERI, D. P. R.; ANDRADE, C.; CARVALHO, C.; ASCHERI, J. L. R. Obtenção de farinhas mistas pré-gelatinizadas a partir de arroz e bagaço de jabuticaba: efeito das variáveis de extrusão nas propriedades de pasta. **B. CEPPA**, v. 24, n. 1, p. 115-144, 2006.

AYALA-ZAVALA, J.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. Use of additives to preserve the quality of fresh-cut fruits and vegetables. **Advances in fresh-cut fruits and vegetables processing**, v., n., p. 231-254, 2011.

AYALA-ZAVALA, J.; ROSAS-DOMÍNGUEZ, C.; VEGA-VEGA, V.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Fruits Using Their Own Byproducts: Looking for Integral Exploitation. **Journal of food science**, v. 75, n. 8, p. R175-R181, 2010.

BAIANO, A.; BEVILACQUA, L.; TERRACONE, C.; CONTÒ, F.; DEL NOBILE, M. A. Single and interactive effects of process variables on microwave-assisted and conventional extractions of antioxidants from vegetable solid wastes. **Journal of Food Engineering**, v. 120, n., p. 135-145, 2014.

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.

BANERJEE, R.; VERMA, A. K.; DAS, A. K.; RAJKUMAR, V.; SHEWALKAR, A.; NARKHEDE, H. Antioxidant effects of broccoli powder extract in goat meat nuggets. **Meat science**, v. 91, n. 2, p. 179-184, 2012.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BAXTER, H.; HARBORNE, J. B.; MOSS, G. P. **Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**: CRC Press, 1998

BENASSI, M. D. T.; ANTUNES, A. J. A comparison of metaphosphoric and oxalic acids as extractants solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. **Arq. biol. tecnol**, v. 31, n. 4, p. 507-513, 1988.

BENDICH, A.; MACHLIN, L.; SCANDURRA, O.; BURTON, G.; WAYNER, D. The antioxidant role of vitamin C. **Advances in Free Radical Biology & Medicine**, v. 2, n. 2, p. 419-444, 1986.

BENZIE, I. F.; STRAIN, 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.

BEZERRA, T. S. Caracterização física, química e morfológica de polpa de marolo liofilizada. v., n., p., 2014.

BLOCK, G. Vitamin C and cancer prevention: the epidemiologic evidence. **The American journal of clinical nutrition**, v. 53, n. 1, p. 270S-282S, 1991.

BOLHASSANI, A.; KHAVARI, A.; BATHAIE, S. Z. Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 1, p. 20-30, 2014.

BORGES, G. D. S. C. Determinação de compostos bioativos e avaliação da atividade antioxidante das diferentes frações dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) cultivados no Estado de Santa Catarina. v., n., p., 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1551-1558, 1995.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. **Carotenoids: handbook**: Springer Science & Business Media, 2004

CAPARINO, O.; TANG, J.; NINDO, C.; SABLANI, S.; POWERS, J.; FELLMAN, J. Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine 'Carabao'var.) powder. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 1, p. 135-148, 2012.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 223-226, 2005.

CARR, A. C.; FREI, B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 69, n. 6, p. 1086-1107, 1999.

CHOI, Y.; JEONG, H.-S.; LEE, J. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. **Food Chemistry**, v. 103, n. 1, p. 130-138, 2007.

CONTRERAS-CALDERÓN, J.; CALDERÓN-JAIMES, L.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2047-2053, 2011.

COSTA, R. P.; MENENDEZ, G.; BRICARELLO, L. P.; ELIAS, M. C.; ITO, M. Óleo de peixe, fitosteróis, soja e antioxidantes: impacto nos lípidos e na aterosclerose. **Rev Soc Cardiol**, v. 10, n. 6, p. 819-827, 2000.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, n. 1, p. 435-442, 1998.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry and molecular biology of plants**, v. 24, n., p. 1250-1319, 2000.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. R. **Fennema's food chemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2008, v.4. 1144 p.

DASARI, S.; WUDAYAGIRI, R.; VALLURU, L. Efficacy of treatment on antioxidant status in cervical cancer patients: A case control study. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2013.

DE ALMEIDA MELO, E.; MACIEL, M. I. S.; DE LIMA, V. L. A. G.; DO NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p., 2008.

DE MELO, M.; SILVESTRE, A.; SILVA, C. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, n., p. 115-176, 2014.

DE OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; DE BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 469-475, 2009.

DE OLIVEIRA ALVES, C. C.; DE RESENDE, J. V.; CRUVINEL, R. S. R.; PRADO, M. E. T. Estabilidade da microestrutura e do teor de carotenóides de pós obtidos da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) liofilizada. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 28, n. 4, p. 830-839, 2008.

DE SOUZA-SARTORI, J. A.; SCALISE, C.; BAPTISTA, A. S.; LIMA, R. B.; DE AGUIAR, C. L. Parâmetros de influência na extração de compostos fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar com atividade antioxidante total= Parameters of influence on extraction of phenolic compounds from sugarcane tops with total antioxidant activity. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p., 2012.

DE SOUZA SCHMIDT GONCALVES, A. E.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666-4674, 2010.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**: EdiPUCRS, 2007

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.

DELGADO, T.; FERREIRA, A.; PEREIRA, J. A.; BAPTISTA, P.; CASAL, S.; RAMALHOSA, E. Avaliação do efeito das condições experimentais sobre a capacidade redutora total de extratos de alface através de um desenho experimental. v., n., p., 2013.

DELPINO-RIUS, A.; ERAS, J.; VILARÓ, F.; CUBERO, M. Á.; BALCELLS, M.; CANELA-GARAYOA, R. Characterisation of phenolic compounds in processed fibres from the juice industry. **Food Chemistry**, v. 172, n., p. 575-584, 2015.

DENG, G.-F.; SHEN, C.; XU, X.-R.; KUANG, R.-D.; GUO, Y.-J.; ZENG, L.-S.; GAO, L.-L.; LIN, X.; XIE, J.-F.; XIA, E.-Q. Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 7, p. 8308-8323, 2012.

DEY, G.; SACHAN, A.; GHOSH, S.; MITRA, A. Detection of major phenolic acids from dried mesocarpic husk of mature coconut by thin layer chromatography. **Industrial Crops and Products**, v. 18, n. 2, p. 171-176, 2003.

DORTA, E.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: Effect on antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 261-268, 2012.

DOS SANTOS, V. J.; BIONDO, P. B. F.; ROTTA, E. M.; MORAIS, D. R.; VISENTAINER, J. V. Drying Optimization by evaluating the antioxidant activity of waste (seed/peel) of passion fruit. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 5, n. 2, p. 10-16, 2014.

DUBA, K. S.; CASAZZA, A. A.; MOHAMED, H. B.; PEREGO, P.; FIORI, L. Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: experiments and modeling. **Food and Bioprocess Technology**, v., n., p., 2015.

EL-SHOUBAGY, G. A.; EL-ZAHAR, K. M. Oxidative stability of ghee as affected by natural antioxidants extracted from food processing wastes. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, n. 2, p. 213-220, 2014.

ELIASSEN, A. H.; LIAO, X.; TWOROGER, S. S.; HANKINSON, S. E. Plasma carotenoids and risk of breast cancer over 20 years of follow-up in the Nurses' Health Study. **Cancer Research**, v. 74, n. 19 Supplement, p. 2919-2919, 2014.

ERDMAN, J. W. Variable bioavailability of carotenoids from vegetables. **The American journal of clinical nutrition**, v. 70, n. 2, p. 179-180, 1999.

FAVELL, D. A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. **Food Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 59-64, 1998.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FESKANICH, D.; ZIEGLER, R. G.; MICHAUD, D. S.; GIOVANNUCCI, E. L.; SPEIZER, F. E.; WILLETT, W. C.; COLDITZ, G. A. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 22, p. 1812-1823, 2000.

FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 466-488, 2014.

GARAU, M. C.; SIMAL, S.; ROSSELLO, C.; FEMENIA, A. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1014-1024, 2007.

GAREWAL, H. S.; MEYSKENS JR, F. Retinoids and carotenoids in the prevention of oral cancer: a critical appraisal. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 1, n. 2, p., 2014.

GENOVESE, M.; PINTO, M. D. S.; GONÇALVES, A. D. S. S.; LAJOLO, F. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 3, p. 207-214, 2008.

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370-1373, 2005.

GEORGÉ, S.; TOURNIAIRE, F.; GAUTIER, H.; GOUPY, P.; ROCK, E.; CARIS-VEYRAT, C. Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1603-1611, 2011.

GOKCE, N.; KEANEY, J. F.; FREI, B.; HOLBROOK, M.; OLESIAK, M.; ZACHARIAH, B. J.; LEEUWENBURGH, C.; HEINECKE, J. W.; VITA, J. A. Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 99, n. 25, p. 3234-3240, 1999.

GOMES, T.; CAPONIO, F. Possibility of improving the quality characteristics of olive-pomace oil and enhancing its differentiation from refined olive-pomace oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 1, p. 62-67, 2001.

GONÇALVES, A. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C.** 2008. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GONZALO, J. R.; ALONSO, M. G. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. **Alimentación Nutrición y Salud**, v. 9, n. 2, p. 31-38, 2002.

GORINSTEIN, S.; MARTÍN-BELLOSO, O.; PARK, Y.-S.; HARUENKIT, R.; LOJEK, A.; ČÍŽ, M.; CASPI, A.; LIBMAN, I.; TRAKHTENBERG, S. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. **Food Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 309-315, 2001.

GORINSTEIN, S.; MARTIN-BELLOSO, O.; LOJEK, A.; ČÍŽ, M.; SOLIVA-FORTUNY, R.; PARK, Y. S.; CASPI, A.; LIBMAN, I.; TRAKHTENBERG, S. Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 10, p. 1166-1170, 2002.

GRUZ, A.; SOUSA, C. G. S. E.; TORRES, A. G.; FREITAS, S. P.; CABRAL, L. M. C. Recuperação de compostos bioativos a partir do bagaço de uva. **Rev. Bras. Frutic**, v. 35, n. 4, p. 1147-1157, 2013.

HO, K.; FERRUZZI, M.; LICEAGA, A.; SAN MARTÍN-GONZÁLEZ, M. Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: effect of extraction conditions on all-trans and cis-isomer yields. **LWT-Food Science and Technology**, v., n., p., 2015.

HOFE, C. R.; FENG, L.; ZEPHYR, D.; STROMBERG, A. J.; HENNIG, B.; GAETKE, L. M. Fruit and vegetable intake, as reflected by serum carotenoid concentrations, predicts reduced probability of polychlorinated biphenyl-associated risk for type 2 diabetes: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. **Nutrition Research**, v. 34, n. 4, p. 285-293, 2014.

HOSSAIN, M.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A. B.; BRUNTON, N. Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, v. 123, n. 1, p. 85-91, 2010.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, W.; XUE, A.; NIU, H.; JIA, Z.; WANG, J. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1147-1154, 2009.

INFANTE, J.; SELANI, M. M.; TOLEDO, N.; SILVEIRA, M.; ALENCAR, S.; SPOTO, M. H. F. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DE FRUTAS TROPICAIS. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 24, n. 1, p. 92, 2013.

ISMAIL, A.; MARJAN, Z. M.; FOONG, C. W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v. 87, n. 4, p. 581-586, 2004.

JACOB, R. A.; SOTOUDEH, G. Vitamin C function and status in chronic disease. **Nutrition in Clinical Care**, v. 5, n. 2, p. 66-74, 2002.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RINCÓN, M.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5489-5493, 2001.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. **European journal of medicinal chemistry**, v. 70, n., p. 102-110, 2013.

JUNIOR, J.; NEIVA, J.; RODRÍGUEZ, N.; PIMENTEL, J.; LÔBO, R. Consumo e digestibilidade de subprodutos do processamento de frutas em ovinos. **R. Bras. Zootec**, v. 34, n. 2, p. 659-669, 2005.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 193-202, 2005.

KABIR, F.; TOW, W. W.; HAMAUZU, Y.; KATAYAMA, S.; TANAKA, S.; NAKAMURA, S. Antioxidant and cytoprotective activities of extracts prepared from fruit and vegetable wastes and by-products. **Food Chemistry**, v. 167, n., p. 358-362, 2015.

KALT, W.; FORNEY, C. F.; MARTIN, A.; PRIOR, R. L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4638-4644, 1999.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. **International journal of food science & technology**, v. 45, n. 2, p. 216-222, 2010.

KATSUBE, T.; TSURUNAGA, Y.; SUGIYAMA, M.; FURUNO, T.; YAMASAKI, Y. Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 964-969, 2009.

KHACHIK, F.; BEECHER, G. R.; SMITH, J. C. Lutein, lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 59, n. S22, p. 236-246, 1995.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328-2375, 2013.

KIM, S.-J.; MIN, S. C.; SHIN, H.-J.; LEE, Y.-J.; CHO, A. R.; KIM, S. Y.; HAN, J. Evaluation of the antioxidant activities and nutritional properties of ten edible plant extracts and their application to fresh ground beef. **Meat science**, v. 93, n. 3, p. 715-722, 2013.

KIM, S.; PARK, J.; HWANG, I. Composition of main carotenoids in Korean red pepper (*capsicum annum*, L) and changes of pigment stability during the drying and storage process. **Journal of food science**, v. 69, n. 1, p. FCT39-FCT44, 2004.

KIM, Y.-N.; GIRAUD, D. W.; DRISKELL, J. A. Tocopherol and carotenoid contents of selected Korean fruits and vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 6, p. 458-465, 2007.

KLEIN, B.; PERRY, A. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. **Journal of food science**, v. 47, n. 3, p. 941-945, 1982.

KONTEK, R.; JAKUBCZAK, M.; MATLAWSKA-WASOWSKA, K. The antioxidants, vitamin A and E but not vitamin C and melatonin enhance the proapoptotic effects of irinotecan in cancer cells in vitro. **Toxicology in vitro**, v. 28, n. 2, p. 282-291, 2014.

KROKIDA, M.; TSAMI, E.; MAROULIS, Z. Kinetics on color changes during drying of some fruits and vegetables. **Drying Technology**, v. 16, n. 3-5, p. 667-685, 1998.

KROKIDA, M.; KARATHANOS, V.; MAROULIS, Z. Effect of freeze-drying conditions on shrinkage and porosity of dehydrated agricultural products. **Journal of Food Engineering**, v. 35, n. 4, p. 369-380, 1998.

KROKIDA, M.; PHILIPPOPOULOS, C. Volatility of apples during air and freeze drying. **Journal of Food Engineering**, v. 73, n. 2, p. 135-141, 2006.

LAGOUGE, M.; LARSSON, N. G. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. **Journal of internal medicine**, v. 273, n. 6, p. 529-543, 2013.

LAPORNIK, B.; PROŠEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, n. 2, p. 214-222, 2005.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390-1393, 1997.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products::(A) the upgrading concept;(B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LEATHERMAN, G.; DURANTINI, E.; GUST, D.; MOORE, T.; MOORE, A.; STONE, S.; ZHOU, Z.; REZ, P.; LIU, Y.; LINDSAY, S. Carotene as a molecular wire: conducting atomic force microscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 20, p. 4006-4010, 1999.

LLORACH, R.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; FERRERES, F. Valorization of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) by-products as a source of antioxidant phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2181-2187, 2003.

LLORACH, R.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; FERRERES, F. Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5109-5116, 2004.

MACHADO, A. P. D. F.; PASQUEL-REÁTEGUI, J. L.; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*rubus fruticosus* L.) residues. A comparison with conventional methods. **Food Research International**, v., n., p., 2015.

MARIA DO SOCORRO, M. R.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

MARTENDAL, E. Aplicação de planejamento fatorial fracionário e box-behnken para otimização de extração com microgota para determinação de tricloroanisol e tribromoanisol de amostras de vinho por cromatografia a gás. v., n., p., 2007.

MARTINS, R.; CHIAPETTA, S.; PAULA, F.; GONÇALVES, E. Evaluation isotonic drink fruit and vegetables shelf life in 30 days. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 623-629, 2011.

MCNULTY, H. P.; BYUN, J.; LOCKWOOD, S. F.; JACOB, R. F.; MASON, R. P. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane

interactions: X-ray diffraction analysis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 1, p. 167-174, 2007.

MELO, E. D. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L.; ARAÚJO, C. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 1, p. 67-72, 2008.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. D. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1088-1093, 2011.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.; VAN BEEK, T. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 231-237, 2004.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. **Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 331-337, 1997.

MONRAD, J. K.; SUÁREZ, M.; MOTILVA, M. J.; KING, J. W.; SRINIVAS, K.; HOWARD, L. R. Extraction of anthocyanins and flavan-3-ols from red grape pomace continuously by coupling hot water extraction with a modified expeller. **Food Research International**, v. 65, n., p. 77-87, 2014.

MOO-HUCHIN, V. M.; MOO-HUCHIN, M. I.; ESTRADA-LEÓN, R. J.; CUEVAS-GLORY, L.; ESTRADA-MOTA, I. A.; ORTIZ-VÁZQUEZ, E.; BETANCUR-ANCONA, D.; SAURI-DUCH, E. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, v. 166, n., p. 17-22, 2015.

MULLAN, B. A.; YOUNG, I. S.; FEE, H.; MCCANCE, D. R. Ascorbic acid reduces blood pressure and arterial stiffness in type 2 diabetes. **Hypertension**, v. 40, n. 6, p. 804-809, 2002.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 95-111, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 41, n. 5, p. 1523-1542, 2006.

NASCIMENTO, R. D.; ARAÚJO, C. D.; MELO, E. D. A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.) Antioxidant from agri-industrial wastes of the guava fruits (*Psidium guajava* L.). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 2, p. 209-216, 2010.

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Vegetals as natural sources of antioxidants. **Química nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PADAYATTY, S. J.; SUN, H.; WANG, Y.; RIORDAN, H. D.; HEWITT, S. M.; KATZ, A.; WESLEY, R. A.; LEVINE, M. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 7, p. 533-537, 2004.

PAES, J.; DOTTA, R.; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, n., p. 8-16, 2014.

PATTHAMAKANOKPORN, O.; PUWASTIEN, P.; NITITHAMYONG, A.; SIRICHAKWAL, P. P. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 3, p. 241-248, 2008.

PÉNICAUD, C.; ACHIR, N.; DHUIQUE-MAYER, C.; DORNIER, M.; BOHUON, P. Degradation of β -carotene during fruit and vegetable processing or storage: reaction mechanisms and kinetic aspects: a review. **Fruits**, v. 66, n. 06, p. 417-440, 2011.

PESCHEL, W.; SANCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZÍA, I.; JIMENEZ, D.; LAMUELA-RAVENTOS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 137-150, 2006.

PIENIZ, S.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V. D.; ESTEFANEL, V.; ANDREAZZA, R. Avaliação in vitro do potencial antioxidante de frutas e hortaliças. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 33, n. 2, p. 552-559, 2009.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2007.

POKORNÝ, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical applications**: Elsevier, 2001

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power

essay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

QUE, F.; MAO, L.; FANG, X.; WU, T. Comparison of hot air-drying and freeze-drying on the physicochemical properties and antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) flours. **International journal of food science & technology**, v. 43, n. 7, p. 1195-1201, 2008.

RANDHIR, R.; LIN, Y.-T.; SHETTY, K. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 13, n. 3, p. 295-307, 2004.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological research**, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 49, n. 4, p. 311-319, 2001.

REÁTEGUI, J. L. P.; DA FONSECA MACHADO, A. P.; BARBERO, G. F.; REZENDE, C. A.; MARTÍNEZ, J. Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, n., p. 223-233, 2014.

REGIER, M.; MAYER-MIEBACH, E.; BEHSNILIAN, D.; NEFF, E.; SCHUCHMANN, H. Influences of drying and storage of lycopene-rich carrots on the carotenoid content. **Drying Technology**, v. 23, n. 4, p. 989-998, 2005.

REZZOUG, S.-A.; LOUKA, N. Thermomechanical process intensification for oil extraction from orange peels. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 4, p. 530-536, 2009.

RICCIONI, G.; D'ORAZIO, N.; SALVATORE, C.; FRANCESCHELLI, S.; PESCE, M.; SPERANZA, L. Carotenoids and vitamins C and E in the prevention of cardiovascular disease. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 82, n. 1, p. 15-26, 2012.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ROJAS-GRAÜ, M. A. A.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 8, p. 1859-1867, 2013.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Antioxidants: Friends or foe in prevention or treatment of cancer: The debate of the century. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 271, n. 1, p. 49-63, 2013.

SAHRAOUI, N.; VIAN, M. A.; EL MAATAOUI, M.; BOUTEKEDJIRET, C.; CHEMAT, F. Valorization of citrus by-products using Microwave Steam

Distillation (MSD). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 2, p. 163-170, 2011.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. **Nutrition Research**, v. 20, n. 7, p. 941-953, 2000.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v., n. 76, p. 270-276, 1999.

SANTANA, F. C.; SHINAGAWA, F. B.; OLIVEIRA, L. R.; REIS, S. L. R.; SILVA, A. M. D. O.; COSTA, A. M.; MANCINI-FILHO, J. INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS SOLVENTE, TEMPERATURA E TEMPO NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM SEMENTES DE MARACUJÁ GERADA NO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL. **Nutrire**, v. 38, n. Suplemento, p. 75-75, 2013.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jaboticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 3, p. 444-452, 2012.

SAWALHA, S. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 567-574, 2009.

SCARMO, S.; HENEBERY, K.; PERACCHIO, H.; CARTMEL, B.; LIN, H.; ERMAKOV, I.; GELLERMANN, W.; BERNSTEIN, P.; DUFFY, V.; MAYNE, S. Skin carotenoid status measured by resonance Raman spectroscopy as a biomarker of fruit and vegetable intake in preschool children. **European journal of clinical nutrition**, v. 66, n. 5, p. 555-560, 2012.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 11, p. 401-413, 2001.

SENA, R. F.; NUNES, M. L. Utilização de resíduos agroindustriais no processamento de rações para carcinicultura. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 94-102, 2006.

SERVIDDIO, G.; BELLANTI, F.; VENDEMIALE, G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, n., p. 952-968, 2013.

SHAHIDI, F. **Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications**: The American Oil Chemists Society, 1997

SHARMA, A.; ZHOU, W. A stability study of green tea catechins during the biscuit making process. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 568-573, 2011.

SHELEMBE, J. S.; CROMARTY, D.; BESTER, M.; MINNAAR, A.; DUODU, K. G. Effect of acidic condition on phenolic composition and antioxidant potential of aqueous extracts from sorghum (*Sorghum bicolor*) bran. **Journal of Food Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 110-118, 2014.

SHRIKHANDE, A. J. Wine by-products with health benefits. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 469-474, 2000.

SHUI, G.; LEONG, L. P. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 277-284, 2006.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; DOS SANTOS SANTANA, A.; 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, N. A. D.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A. Z.; DE ROSSO, V. V. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5072-5084, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

ŠKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAŠ, A. R.; SIMONIČ, M.; KNEZ, Ž. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, n. 2, p. 191-198, 2005.

SMALL, D. M.; COOMBES, J. S.; BENNETT, N.; JOHNSON, D. W.; GOBE, G. C. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. **Nephrology**, v. 17, n. 4, p. 311-321, 2012.

SNODDERLY, D. M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. **The American journal of clinical nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1448S-1461S, 1995.

SOERJOMATARAM, I.; OOMEN, D.; LEMMENS, V.; OENEMA, A.; BENETOU, V.; TRICHOPOULOU, A.; COEBERGH, J. W.; BARENDREGT, J.; DE VRIES, E. Increased consumption of fruit and vegetables and future cancer incidence in selected European countries. **European Journal of cancer**, v. 46, n. 14, p. 2563-2580, 2010.

SOONG, Y.-Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 411-417, 2004.

SOUSA, M. S.; TREVISAN, A. J.; BASTOS, D. H. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DE MURICI (BYRSONIMA CRASSIFOLIÁ) POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA. **Nutrire**, v. 38, n. Suplemento, p. 92-92, 2013.

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

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of separation science**, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, 2007.

SUN-WATERHOUSE, D.; SIVAM, A.; COONEY, J.; ZHOU, J.; PERERA, C.; WATERHOUSE, G. Effects of added fruit polyphenols and pectin on the properties of finished breads revealed by HPLC/LC-MS and size-exclusion HPLC. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 3047-3056, 2011.

SZETO, Y. T.; TOMLINSON, B.; BENZIE, I. F. Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. **British journal of nutrition**, v. 87, n. 01, p. 55-59, 2002.

TANG, F.-Y. The silver bullet for cancer prevention: Chemopreventive effects of carotenoids. **Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 117-121, 2012.

TESTA, D.; GUERRA, G.; MARCUCCIO, G.; LANDOLFO, P. G.; MOTTA, G. Oxidative stress in chronic otitis media with effusion. **Acta oto-laryngologica**, v. 132, n. 8, p. 834-837, 2012.

TEWOLDE-BERHAN, S.; REMBERG, S. F.; ABEGAZ, K.; NARVHUS, J.; ABAY, F.; WICKLUND, T. Impact of drying methods on the nutrient profile of fruits of *Cordia africana* Lam. in Tigray, northern Ethiopia. v., n., p., 2015.

TORRES, J.; BOBET, R. New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4627-4634, 2001.

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

VAITHIYANATHAN, V.; MIRUNALINI, S. Chemo preventive potential of fruit juice of *Phyllanthus emblica* Linn.(amla) against mammary cancer by altering oxidant/antioxidant status, lipid profile levels and estrogen/progesterone receptor status in female Sprague–Dawley rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 357-366, 2013.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 816-823, 2008.

VIGANÓ, J.; DA FONSECA MACHADO, A. P.; MARTÍNEZ, J. Sub-and supercritical fluid technology applied to food waste processing. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, n., p. 272-286, 2015.

VINSON, J. A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5315-5321, 2001.

VIZZOTTO, M. V.; PEREIRA, M. C. **Metodologia científica: otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade)**: Embrapa Clima Temperado, 2009

WIJNGAARD, H. H.; RÖßLE, C.; BRUNTON, N. A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 202-207, 2009.

WILSON, J. X. Regulation of vitamin C transport. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 25, n., p. 105-125, 2005.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. ANALYSIS OF PROPOLIS: SOME PARAMETERS AND PROCEDURES FOR CHEMICAL QUALITYCONTROL. **Journal of apicultural research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

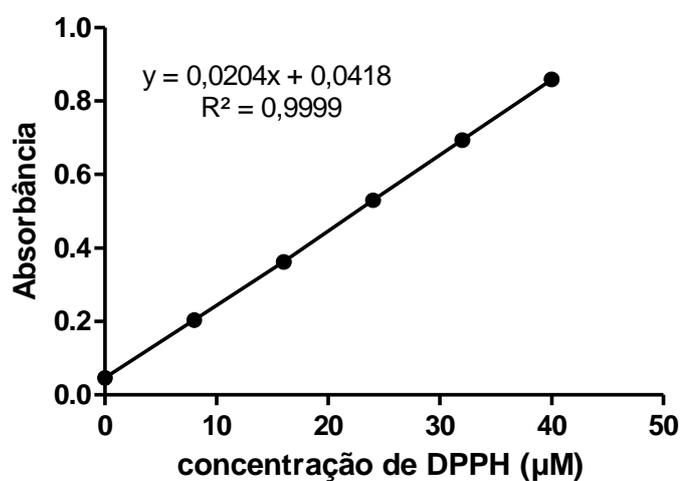
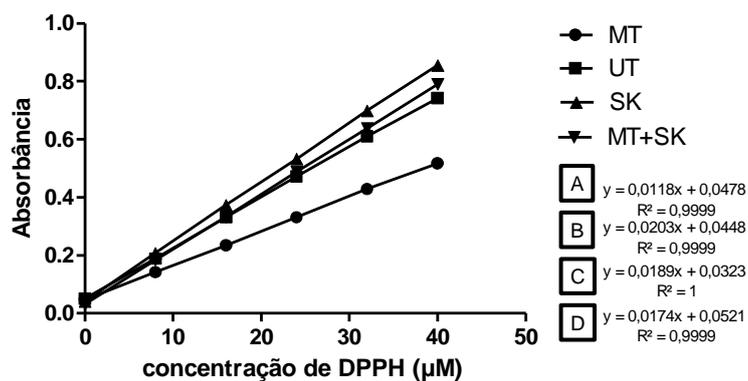
WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Apple peels as a value-added food ingredient. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1676-1683, 2003.

WU, Z.-G.; XU, H.-Y.; MA, Q.; CAO, Y.; MA, J.-N.; MA, C.-M. Isolation, identification and quantification of unsaturated fatty acids, amides, phenolic compounds and glycoalkaloids from potato peel. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2425-2429, 2012.

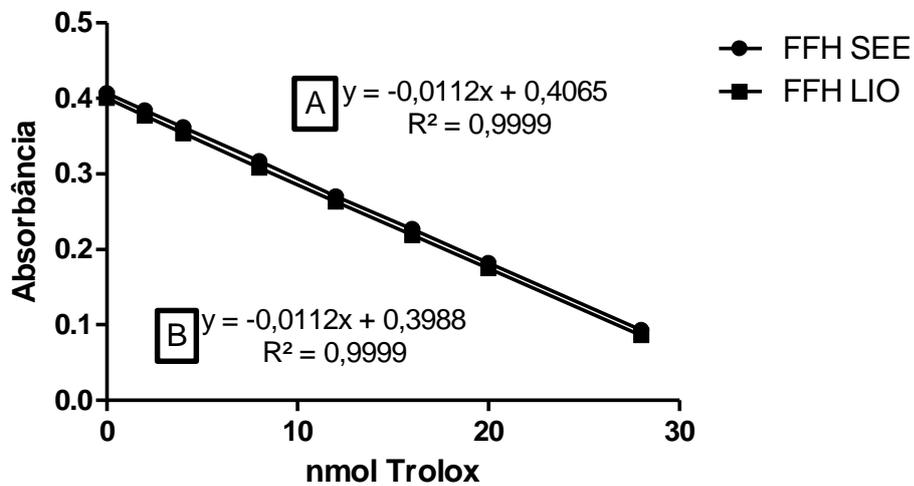
YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. **Food Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 273-278, 2005.

8. ANEXOS

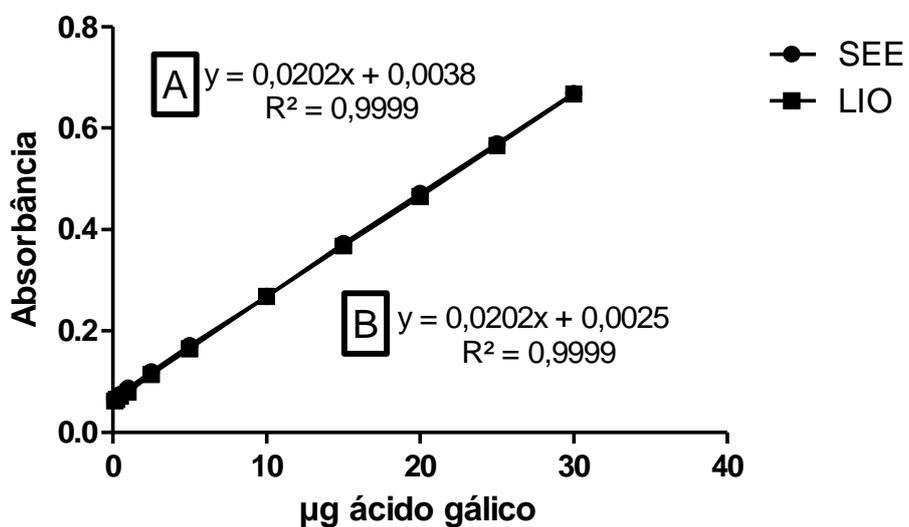
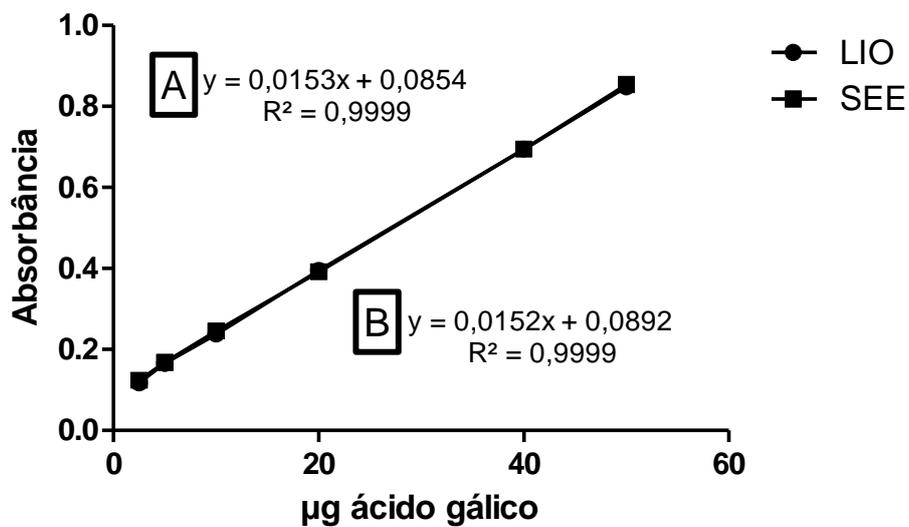
Anexo 1. Exemplos de curvas de calibração do radical DPPH utilizadas para análise das concentrações de EC₅₀ (mg/mL) dos extratos de MT (A), SK (B), MT +Sk (C) e UT (D).



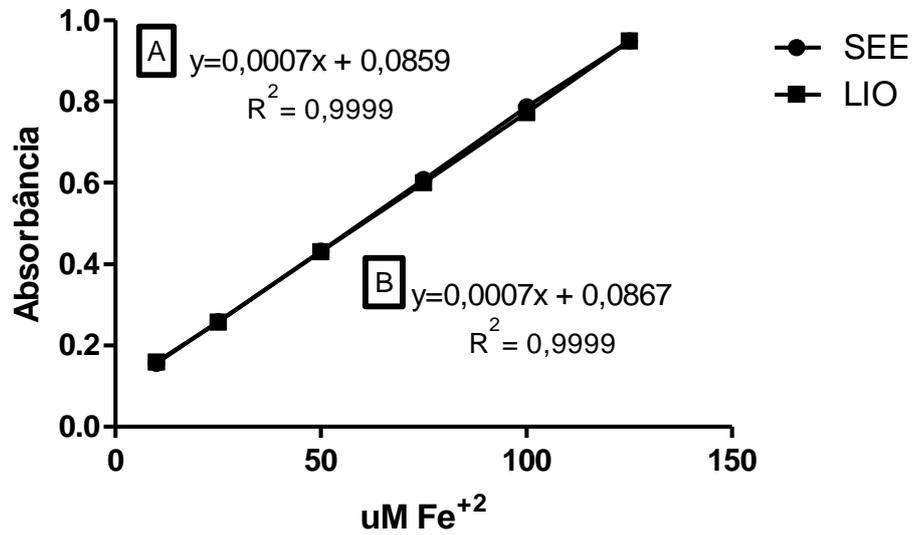
Anexo 2. Curvas de calibração do padrão 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox). As equações das curvas, foram usadas para calcular dos valores de equivalentes em μmol de Trolox/g FFH SEE (A) e LIO (B).



Anexo 3. Curva de calibração do padrão de ácido gálico. As equações foram utilizadas para calcular o teor de mg EAG/g amostra seca, dos extratos das FFH LIO (A) e SEE (B).



Anexo 4. Curvas de calibração do padrão de Fe²⁺. As equações das curvas, foram usadas para cálculo dos valores em equivalentes mM Fe²⁺/g de amostra seca, dos extratos das FFH SEE (A) e LIO (B).



Anexo 5. Curva de calibração do padrão de quercetina. A equação da curva, foi usada para cálculo dos valores em mg de equivalentes de quercetina/g de amostra seca das FFH SEE e LIO.

