



Biorresíduos de *Punica granatum* L. como potencial fonte de compostos fenólicos com aplicação alimentar

Felipe da Silva Veloso

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientação:

João C.M. Barreira

Aziza K. Genena

Isabel C.F.R. Ferreira

Bragança

2019

“O conhecimento só é útil quando nos torna melhores”

Platão

Agradecimentos

Aos meus pais, Celeste e Sérgio, pelo constante e incessante esforço para permitir que a educação fosse parte preponderante da minha vida e por serem esta fonte inesgotável de sabedoria.

Ao IPB e à UTFPR pela oportunidade de formação técnica e pessoal.

Ao Doutor João Barreira, pela orientação no desenvolvimento da dissertação, pelas explicações sempre ricas em conhecimento e entusiasmo e pela infindável paciência.

À Professora Isabel Ferreira, pela oportunidade de trabalhar com sua formidável equipa de investigação e sua constante preocupação com o bem-estar dos alunos.

À Professora Aziza Genena, pelo seu contínuo cuidado e atenção desde o início dos meus estudos universitários na UTFPR, e pela sua tenacidade como exemplar professora e co-orientadora desta dissertação.

À Professora Nádja Steinmacher, professora da UTFPR, pelo auxílio de forma indescritível e essencial, sempre me encorajando e estimulando a buscar novos caminhos.

À Doutora Cristina Caleja, pessoa e profissional com qualidades notórias, peça *sine qua non* para o desenvolvimento desta Dissertação, que me possibilitou ver a Investigação por um prisma que me era desconhecido até então.

À excepcional equipa de investigação do LQBA e do CIMO.

Aos meus amigos e todos que de maneira direta ou indireta me ajudaram na conclusão deste trabalho.

Este trabalho é financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto NORTE-01-0145-FEDER-023289 (DeCodE) e Norte-01-0247-FEDER-024479 (projeto *Mobilizador ValorNatural*), e pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal, no âmbito do projeto 0377_Iberphenol_6_E.



Resumo

Atualmente existe uma clara tendência para a incorporação de ingredientes de base natural em formulações alimentares e farmacêuticas. Este tipo de ingredientes, tem vindo a ser bem aceite por parte dos consumidores uma vez que, a literatura os descreve como apresentando propriedades bioativas com ações benéficas para a saúde do consumidor. Nesta área, os biorresíduos descartados em grande quantidade pela indústria alimentar têm vindo a despertar particular interesse devido não só ao potencial bioativo reconhecido deste tipo de materiais mas, também pelas questões económicas e de impacto ambiental que esta questão acarreta.

O material vegetal que é descartado durante o processamento industrial da romã é um bom exemplo destes biorresíduos, tendo em conta que é um dos vinte frutos mais produzidos a nível mundial e que os resíduos descartados representam uma elevada porção do fruto. A indústria transformadora de romã origina grandes quantidades de produtos laterais, que podem constituir um custo acrescido e material de eliminação difícil. Desta forma, o desenvolvimento de formas eficientes de valorização destes biorresíduos pode significar importantes benefícios económicos e ambientais.

Os compostos fenólicos presentes na casca de romã (*e.g.*, taninos hidrolisáveis e flavonoides) apresentam atividades biológicas (por exemplo atividade antioxidante, anti-inflamatória ou antimicrobiana). Por outro lado, a romã apresenta componentes funcionais, como por exemplo a pectina, que também podem ter grande aplicabilidade no desenvolvimento de formulações alimentares. O trabalho a desenvolver pretende testar a eficiência de três solventes, água, etanol e água/etanol na extração de compostos fenólicos de duas variedades de romã, proceder à sua completa caracterização cromatográfica e avaliar a sua bioatividade. Os extratos de casca de romã, após validação das suas propriedades, serão utilizados como ingredientes para formulações de biscoitos tipo “casadinho”, contribuindo para a promoção da saúde dos consumidores. A casca de romã será duplamente valorizada através da extração da pectina que será também utilizada na formulação do mesmo produto alimentar.

Os compostos fenólicos presentes nos diferentes extratos foram identificados por HPLC-DAD-ESI/MS. Os resultados revelaram a presença de catorze compostos fenólicos na romã Mollar de Elche, destacando-se a punicalagina e o galolil-HHDP-glucose como os maioritários. Por sua vez, os extratos de romã Purple Queen, apresentaram dezessete

compostos fenólicos ainda que em concentrações menores que na cultivar anteriormente citada. Adicionalmente, esta variedade apresentou três antocianinas na sua composição o que poderá justificar a sua cor avermelhada característica da casca. A variedade Mollar de Elche destacou-se por apresentar uma maior atividade antioxidante e antibacteriana.

Com o objetivo de aliar o potencial corante e as características bioativas, selecionou-se a variedade Purple Queen para incorporar num produto de pastelaria tipicamente brasileiro de forma a avaliar a capacidade como ingrediente natural corante e funcionalizante com vista ao aproveitamento de um biorresíduo pouco explorado. Os resultados demonstram que a incorporação do extrato não provocou alterações significativas relativamente ao perfil nutricional mas, conseguiram fornecer uma maior atividade antioxidante relativamente ao produto tradicional.

Desta forma, este trabalho veio confirmar a possível utilização da casca da romã na indústria alimentar como ingrediente natural com potencial corante e funcionalizante o que permitirá uma valorização deste biorresíduo para além de contribuir de forma positiva para a economia e ambiente.

Palavras-chave: Casca de romã; compostos fenólicos; bioatividade; biorresíduos; alimentos funcionais.

Abstract

There is now a clear trend towards the incorporation of natural-based ingredients into food and pharmaceutical formulations. In addition to being well accepted by consumers, these ingredients do not have as much adverse side effects as in the case of artificial components. In a complementary way, and considering the current premises of the circular economy, we have been trying to develop applications that value the high potential contained in this bio-waste, once considered as disposable materials.

The plant material that remains from the industrial processing of pomegranate, one of the twenty most produced fruits worldwide is a good example of these bio-waste. In fact, the pomegranate processing industry produces large quantities of side products, which can be an added cost and a difficult disposal material. In this way, the development of efficient ways of exploiting this bio-waste can have significant economic and environmental benefits.

Phenolic compounds present in pomegranate bark (e.g., hydrolysable tannins and flavonoids) exhibit biological activities (e.g. antioxidant, anti-inflammatory or antimicrobial activity). However, it is necessary to ensure the most efficient extraction not only of the free compounds, but also of those naturally bound to the cell wall, which represent an important percentage in the case of pomegranate. The aim of this work is to test the performance of three solvents, water, ethanol and water / ethanol in the extraction of punicalagin, punicalin, among other antioxidants, to complete its chromatographic characterization and to evaluate its bioactivity. Pomegranate peel extracts, after validation of their properties, will be used as ingredients for "casadinho" type biscuit formulations, contributing to the promotion of consumer health.

The phenolic compounds present in the different extracts were identified by HPLC-DAD-ESI / MS. The results revealed a presence of fourteen phenolic compounds in the Mollar of Elche, highlighting a punicalagin and galloyl-HHDP-glucose as the major compounds. In turn, the extracts of pomegranate Queen Purple, stimulate the phenolic compounds even in units smaller than the previously mentioned cultivar. Additionally, this variety has three anthocyanins in its composition that may justify its characteristic reddish color of the bark. The Mollar of Elche of the variety stood out to present a greater antioxidant and antibacterial activity.

In order to ally the potential dye and the bioactive characteristics, the Purple Queen variety was selected to be incorporated in a typical Brazilian pastry product in order to evaluate the capacity as a natural coloring and functionalizing ingredient with a view to the use of a little explored bio-residue. The results showed that the incorporation of the extract did not cause significant alterations regarding the nutritional profile, but they were able to provide a higher antioxidant activity compared to the traditional product.

In this way, this work confirmed the possible use of the pomegranate peel in the food industry as a natural ingredient with potential dyeing and functionalizing, which will allow a valorization of this bio-residue besides contributing positively to the economy and environment.

Keywords: Pomegranate peel; free phenolic compounds bound to the cell wall; extraction optimization; bioactivity.

Índice**Sumário**

<i>Resumo</i>	1
<i>Abstract</i>	3
<i>Lista de Figuras</i>	vii
<i>Lista de Tabelas</i>	ix
<i>Lista de Abreviaturas</i>	x
1. Introdução	1
1.2. Romã (<i>Punica granatum</i> L.).....	2
1.3. EconomiaCircular	4
1.4. Compostos fenólicos	5
1.4.1.Classificação de compostos fenólicos	7
1.4.2.Compostos fenólicos livres, esterificados e ligados à parede celular	15
1.4.3 Compostos fenólicos em <i>Punica granatum</i> L.....	16
1.4.4 Bioatividade dos compostos fenólicos de <i>Punica granatum</i> L.....	19
1.4.4.1 Atividade antioxidante.....	20
1.4.4.2 Propriedades anti-tumoral e citotóxica	21
1.4.4.3. Atividade antimicrobiana	22
1.4.5 Extração de compostos bioativos	22
1.5. Pectina	24
1.5.1 Estrutura química da pectina.....	25
1.5.2. Características da pectina.....	26
2. Objetivos	28
3. Metodologia	30
3.1 Preparação das amostras.....	30
3.2 Reagentes.....	30
3.3 Extração de compostos fenólicos.....	31
3.4 Determinação de compostos fenólicos.....	31
3.5 Avaliação das propriedades bioativas da casca da romã.....	32
3.5.1 Atividade antioxidante.....	32
3.5.2 Avaliação da atividade antitumoral	34
3.6. Extração Pectina	35

3.7.Incorporação do extrato num produto de pastelaria.....	37
3.7.1 Preparação das amostras	37
3.7.2. Avaliação das propriedades físicas dos casadinhos.....	38
3.7.2.1. Avaliação da cor ao longo do tempo	38
3.7.2.2. Avaliação da textura ao longo do tempo.....	39
3.7.2.3. Avaliação das propriedades nutricionais dos casadinhos ao longo do tempo	39
3.7.2.4. Avaliação da atividade antioxidante das diferentes amostras de casadinhos ao longo do tempo	41
3.8. Análise Estatística	42
4. Resultados e Discussão	43
4.1. Caracterização fenólica dos extratos de casca de romã.....	43
4.2. Caracterização da bioatividade dos extratos de casca de romã	50
4.3. Caracterização das novas formulações de casadinhos	56
4.3.1. Composição nutricional e perfil em açúcares dos “casadinhos”	57
4.3.2. Perfil em ácidos gordos dos “casadinhos”	58
4.3.3 Parâmetros colorimétricos e características texturais dos “casadinhos”.....	61
4.3.4. Bioatividade das formulações de “casadinhos”	62
5. Conclusão	63
6. Referências	65

Lista de Figuras

Figura 1 - Romãzeira com frutos maduros..	2
Figura 2 - Romã seccionada para evidenciar o albedo, membranas do mesocarpo e arilos.	3
Figura 3 - Esquema da Economia Circular.	4
Figura 4 - Esquema geral da biossíntese de flavonoides.	6
Figura 5 - Classificação de compostos fenólicos.	10
Figura 6 - Estrutura básica de um flavonoide.	11
Figura 7 - Estruturas químicas de alguns ácidos hidroxibenzóicos.	13
Figura 8 - Estruturas químicas de alguns ácidos hidroxicinâmicos.	14
Figura 9 - Representação de uma secção da parede celular e das ligações estruturais entre os seus componentes e os compostos fenólicos.	15
Figura 10 - Estrutura química do ácido gálico e ácido elágico.	17
Figura 11 - Estrutura química da punicalagina.	18
Figura 12 - Estrutura química da punicalina.	18
Figura 13 - Estrutura da Parede Celular.	24
Figura 14 - Ácido galacturônico. Principal monômero das pectinas	25
Figura 15 - Homogalacturonana (HGA). Ácido galacturônico com ligação glicosídica (1,4).	26
Figura 16 - Representação esquemática dos objetivos do presente trabalho.	29
Figura 17 - Microplaca para análise inibição da E.coli.	33
Figura 18 - Romã rosa (esquerda) e Romã amarela (direita) extração pectina com pH de 1,5.	36
Figura 19 - Romã Purple Queen e Romã Mollar de Elche extração pectina com pH de 3.	37
Figura 20 - Amostras dos casadinhos.	38
Figura 21 - Texturômetro.	39
Figura 22 - Extração de ácidos gordo por Soxhlet.	40
Figura 23 – Romã Mollar de Elche.	43
Figura 24 – Romã Purple Queen.	44

Figura 25 - Diferentes formulações de casadinhos. A: tradicional; B: CEC; C: CECP. 56

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Estruturas básicas de alguns compostos fenólicos..... 7

Tabela 2 - Ocorrência, efeitos fisiológicos, exemplos, e estrutura exemplificativa dos diferentes subgrupos de flavonoides. 11

Tabela 3. Tempo de retenção (R_t), comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{máx}$), dados espectrais de massa e tentativa de identificação dos compostos fenólicos..... 47

Tabela 4. Quantificação de compostos fenólicos (mg/100 g de peso seco) em diferentes extratos da casca de romã da variedade Mollar de Elche. 48

Tabela 5. Quantificação de compostos fenólicos (mg/100 g de peso seco) em diferentes extratos da casca de romã da variedade Purple 49

Tabela 6. Resultados da inibição de formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da citotoxicidade em diferentes extratos da casca de romã das variedades Mollar de Elche e Purple Queen. 52

Tabela 7. Resultados da atividade antibacteriana de diferentes extratos da casca de romã das variedades Mollar de Elche e Purple Queen. 53

Tabela 8. Composição nutricional, açúcares livres (g/100 g) e valor energético (kcal/100 g) das diferentes formulações de “casadinhos”..... 59

Tabela 9. Perfil em ácidos gordos das diferentes formulações de “casadinhos”. 60

Tabela 10. Parâmetros colorimétricos e características texturais das diferentes formulações de “casadinhos”. 63

Lista de Abreviaturas

AAPH - di-hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)

AGal - ácido D-galacturónico

CMI - concentração mínima inibitória

CMB - concentração mínima bactericida

C - casadinhos controlo

DM - grau de metilação

DMEM - meio de cultura para células animais

DMSO – dimetilsulfóxido

EG₅₀ - representa a concentração de amostra que fornece 50% de atividade antioxidante

FAME - ésteres metílicos de ácidos gordos

FID - detetor de ionização em chama

GI₅₀- corresponde à concentração de extrato que inibe 50% do crescimento celular

GLOBOCON - Global Cancer Observatory

GC-FID - cromatografia gasosa com deteção por ionização em chama

HBSS - solução salina equilibrada de Hank

HeLa - carcinoma cervical

HepG2 - carcinoma hepatocelular

HGA - homogalacturonana

HM - alta metilação, sigla em inglês

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-RI - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração

HPLC-DAD-ESI/MS - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos e a um detetor de espectrometria de massa com uma fonte de ionização por espalhamento de eletrões

INT- cloreto de iodonitrotetrazólio;

LM - baixa metilação

LPS - lipopolissacáridos

MCF-7 - carcinoma de mama

MHB - meio de cultura Muller-Hinton Broth

MHB - Mueller-Hinton agar

NED - N-(-naftil) etilenodiamina

NCI-H460 - Carcinoma de pulmão

PGE2 - prostaglandina E2

PBS - solução tamponada de fosfato

PLP2 - células não tumorais de fígado de porco

RG-I - ramnogalacturonana I

RG-II - ramnogalacturonana II

RG - casadinhos enriquecidos com extrato de casca de romã vermelha e goiabada

RR - casadinhos enriquecidos com extrato de geleia de sumo e pectina de roma vermelha

SFB - sêrum fetal bovino

SRB - sulforrodamina B

TBARS - substâncias reativas a ácido tiobarbitúrico

TCA - ácido tricloroacético

UFC- unidades formadora de colónias

1. Introdução

As plantas têm vindo a ser utilizadas desde tempos remotos, como fontes naturais de componentes ativos com propriedades benéficas para a saúde (Ferraro, Martino, & Bandoni, 2000). A potencial utilização destes componentes como ingredientes de formulações alimentares adaptadas às exigências atuais dos consumidores é grandemente potenciada se as fontes naturais desses ingredientes forem matrizes naturais com grande disseminação, e em especial se puderem ser obtidas a baixo custo. Nesta perspetiva, a utilização dos produtos laterais que remanescem após o processamento industrial de produtos vegetais assume-se como uma abordagem com elevada probabilidade de sucesso, para além de auxiliar na resolução de problemas ambientais e ecológicos prementes (Gullón, Garrote, Alonso, & Parajó, 2007). O intenso crescimento do setor hortofrutícola a nível mundial tem vindo a produzir quantidades alarmantes de resíduos vegetais (Gullón et al., 2007). Contudo, estes biorresíduos são tipicamente ricos em compostos de elevado valor como são os casos dos polifenóis, vitaminas ou fibras (Barbulova, Colucci, & Apone, 2015).

No caso específico da romã, um dos vinte frutos mais produzidos a nível mundial, a utilização dos produtos laterais resultantes do seu processamento para a obtenção de diferentes produtos, torna-se especialmente interessante em virtude da elevada quantidade de compostos específicos, tal como bem exemplificado pelos compostos fenólicos, e em particular pelos elagitaninos (Fawole, Makunga, & Opara, 2012). Assim, é importante definir técnicas de extração adequadas, preferencialmente exequíveis em condições operacionais que garantam a integridade dos compostos-alvo. Adicionalmente, é também importante que se definam metodologias com a capacidade de extrair não só os compostos fenólicos livres, mas também aqueles que se encontram ligados a componentes da parede celular, e que muitas vezes representam uma percentagem significativa dos compostos fenólicos totais.

1.2. Romã (*Punica granatum* L.)

A romã, *Punica granatum* L., é o fruto produzido por um arbusto lenhoso (romãzeira), que pode atingir alturas entre 5 e 10 metros. Durante algum tempo, a romã foi incluída na família Punicaceae, mas os resultados obtidos em estudos moleculares acabaram por reclassificá-la taxonomicamente, posicionando a romã na família Lythraceae (Huang & Shi, 2002).

A romãzeira (**Figura 1**) é uma árvore especialmente adaptada ao clima do Mediterrâneo, com estações do ano claramente distintas, apesar de também se desenvolver bem em ambientes com clima húmido, como os trópicos e subtropicais, onde o seu crescimento pode ser menos significativo devido à ação de fungos nas suas raízes. Apresenta-se tipicamente como uma árvore de pequeno porte com forte ramificação (Erkan & Kader, 2011).



Figura 1 - Romãzeira com frutos maduros. **Fonte:** jardinagempaisagismo.com/roma.

O período de floração varia de acordo com o clima no qual a planta está inserida. Nos climas tropicais, a floração tende a ocorrer em vários momentos do ano, enquanto nas regiões subtropicais ocorre apenas uma vez por ano (D. An et al., 2018). As flores são bissexuadas, axilares ou terminais, e podem apresentar formação aglomerada ou solitária (Hitsman et al., 2013).

A casca de romã possui duas partes: a exterior apresenta um pericarpo rígido, e a interior constituída por um mesocarpo esponjoso esbranquiçado (albedo), que compreende a parede interna do fruto, no qual se encontram os arilos. As membranas do mesocarpo (constituídas por uma série de células epidérmicas) são organizadas de forma assimétrica como “compartimentos”, funcionando como uma proteção dos arilos, sendo eles a parte edível do fruto. A cor dos arilos pode variar desde quase transparente até vermelho escuro (**Figura 2**), dependendo da cultivar de romã (An et al., 2018).



Figura 2 - Romã seccionada para evidenciar o albedo, membranas do mesocarpo e arilos. **Fonte** - pt.wikipedia.org/wiki/Romã

A produção anual de romã ronda 1.500.000 toneladas métricas, posicionando este fruto entre os vinte mais consumidos a nível mundial, para o que muito contribui o seu paladar apelativo e as propriedades benéficas que o seu consumo tem na saúde (García, 2016). A romã é utilizada em diferentes produtos como sumo, concentrados, geleias, compotas, infusões e decocções, vinho, diferentes produtos farmacêuticos e medicinais, corantes naturais, óleo de sementes, ou simplesmente como objeto decorativo (Karimi, Sadeghi, & Kokini, 2017). Considerando que a parte edível da romã representa pouco mais de 50% do fruto (Yang et al., 2018), os produtos laterais do seu processamento têm um elevado potencial como fonte de compostos bioativos de interesse, tal como será detalhado no capítulo 3 deste trabalho.

1.3. Economia Circular

Anualmente desperdiça-se cerca de 1,3 bilhão de toneladas de alimentos na Europa, dos quais, aproximadamente 700 milhões de toneladas são provenientes da agricultura (Toop et al., 2017). Uma grande parcela desses produtos da cadeia lateral, que são considerados resíduos, são uma fonte de compostos químicos e bioativos, que atualmente tem vindo a ser explorados como fonte de energia e despertado o interesse das mais diversas áreas industriais, nomeadamente a alimentar (Lin et al., 2014). Na **Figura 3** está apresentado o esquema do processo genérico de funcionamento da economia circular.

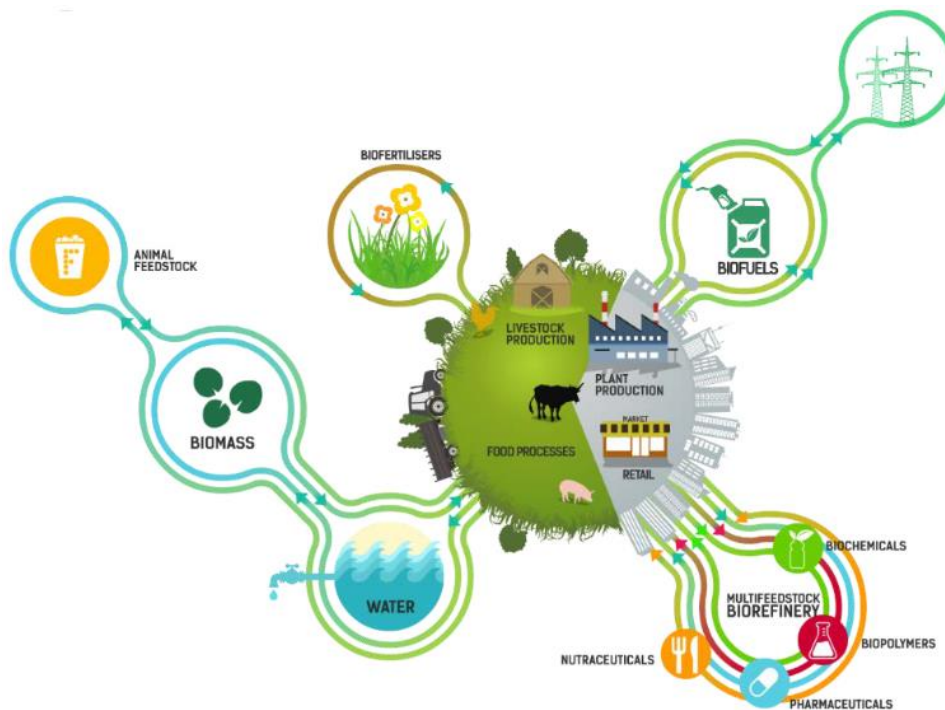


Figura 3 - Esquema da Economia Circular. **Fonte:** (Toop et al., 2017)

A identificação e avaliação de compostos bioativos com potencial valor agregado que podem ser obtidos a partir de bioresíduos até então descartados com pouco valor associado, exige uma pesquisa analítica robusta, eficiente, reproduzível e benigna. A utilização de métodos de separação considerados verdes e sustentáveis para produtos derivados de resíduos da agro-indústria é claramente atrativo. Assim, nesse campo de pesquisa há a necessidade de inovação, visando encontrar de modo sustentável e eficiente

métodos de separação para os produtos da cadeia lateral da agro-indústria (Zuin & Ramin, 2018).

1.4. Compostos fenólicos

No reino Plantae, os processos metabólicos das plantas são genericamente divididos em primário e secundário. No metabolismo primário, são produzidas as substâncias básicas e essenciais à sobrevivência e manutenção do organismo vegetal, entre os quais se destacam as proteínas, lípidos, glícidos e ácidos nucleicos. Por outro lado, no metabolismo secundário, são biossintetizadas substâncias mais diretamente relacionadas com os mecanismos de defesa da planta, sendo o metaboloma secundário altamente definido pela espécie vegetal, contrariamente ao metaboloma primário, que apresenta uma composição mais ou menos similar entre diferentes espécies (Zhong, 2011).

Os compostos fenólicos constituem um grupo de substâncias muito numeroso e globalmente distribuído pelas espécies vegetais, tendo já sido identificadas mais de 8000 estruturas. Os compostos sintetizados através das vias da pentose-fosfato, chiquimato ou fenilpropanoides, estão entre os grupos mais importantes de metabolitos secundários produzidos pelas plantas (Barnes, 2010; Randhir, Lin, & Shetty, 2004). Na sua maioria, os compostos fenólicos são sintetizados através da via fenilpropanoide, que se inicia com o ácido 4-hidroxicinâmico (ou ácido *p*-cumárico, um derivado desaminado da fenilalanina) (Hollman, 2001). A combinação das vias chiquimato ou fenilpropanoides está associada à biossíntese de flavonoides (**Figura 4**), que representam o grupo de compostos fenólicos mais abundante na natureza (Haminiuk, Maciel, Plata-Oviedo, & Peralta, 2012).

A estrutura química básica de um composto fenólico é formada por pelo menos um anel benzóico com grupos hidroxilo livres ou associados à estrutura cíclica, através de ligações éster, éter ou glicosídicas (Jackson, 2000). São assim considerados como compostos fenólicos todos aqueles que, não sendo azotados, possuem um ou mais anéis aromáticos (Barrozo, Santos, Cunha, 2013)

Além da sua participação no sistema de defesa da planta, estes compostos desempenham atividades importantes a nível do desenvolvimento geral da planta, auxiliando no estabelecimento de associações ecológicas e participando no crescimento morfológico e nos processos fisiológicos (Mierziak, Kostyn, & Kulma, 2014).

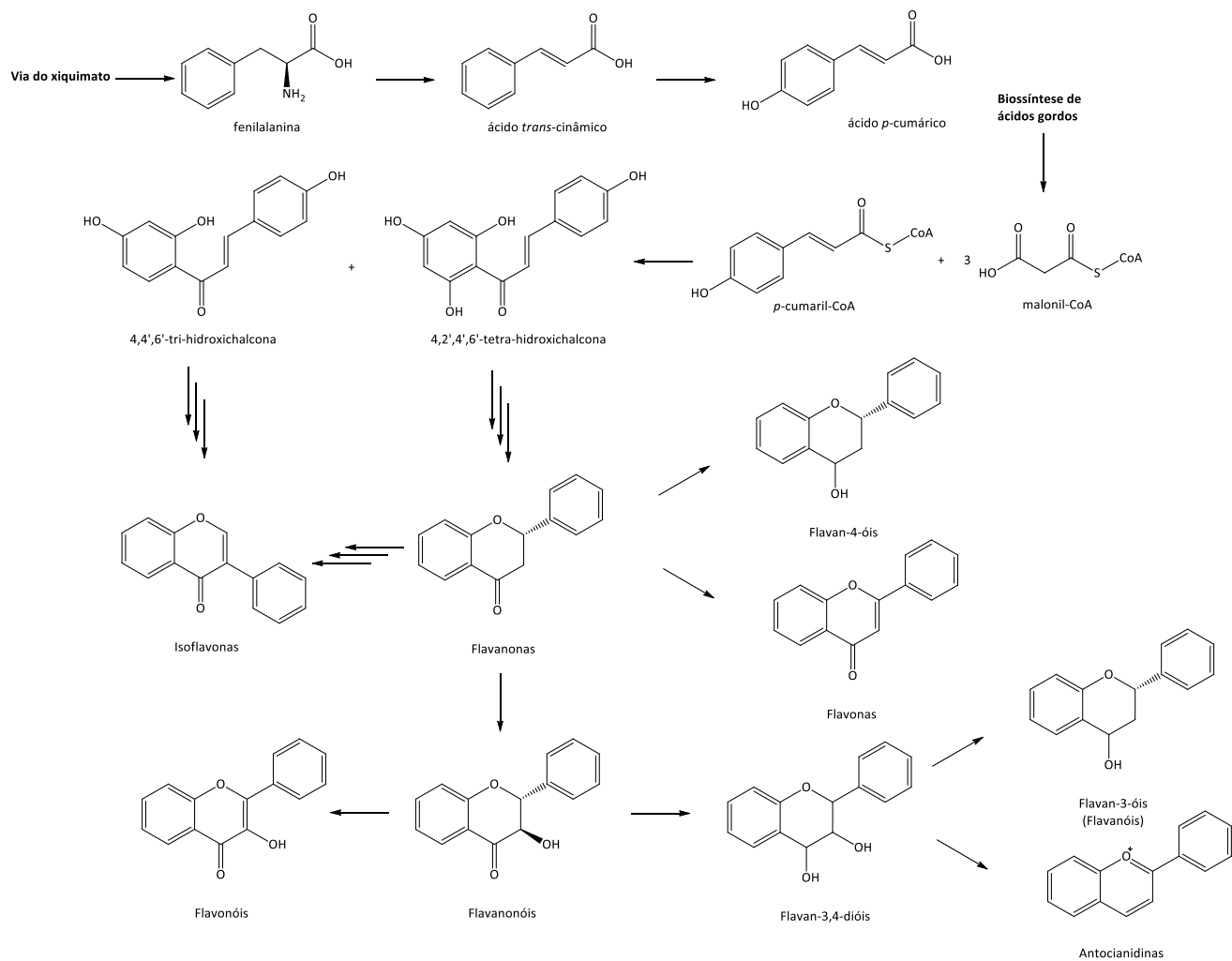
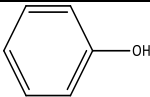
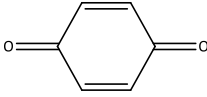
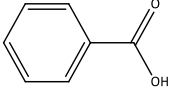
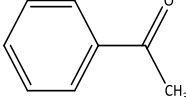
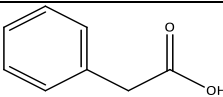
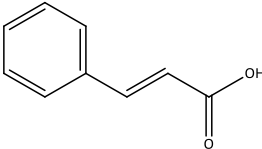
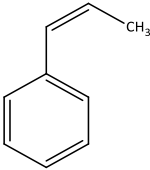


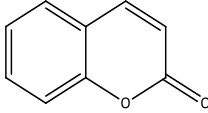
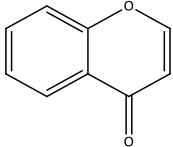
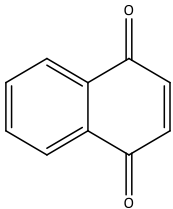
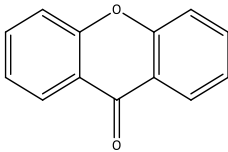
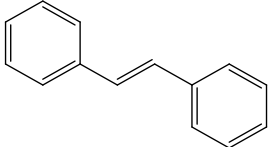
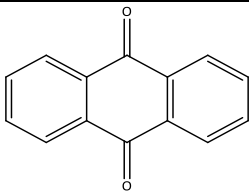
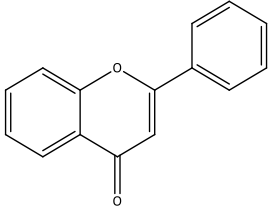
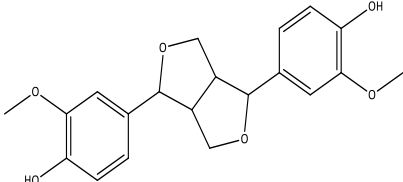
Figura 4 - Esquema geral da biossíntese de flavonoides. Fonte - (Jaakola, 2007)

1.4.1. Classificação de compostos fenólicos

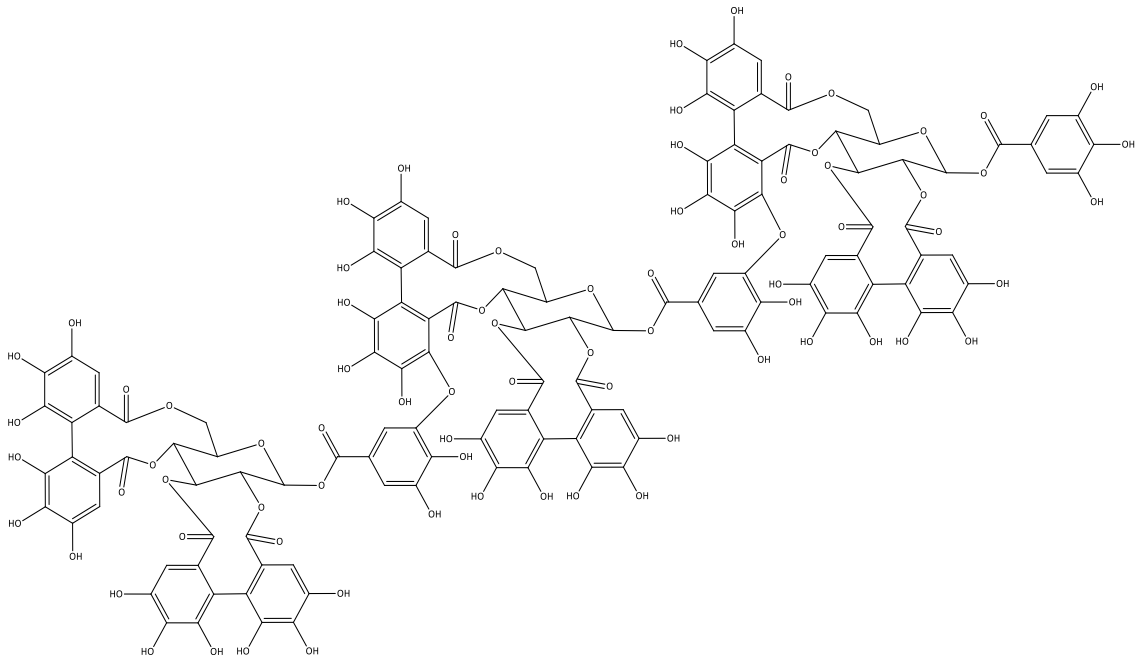
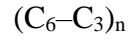
Do ponto de vista químico, os compostos fenólicos são caracterizados por apresentarem um anel aromático com pelo menos um substituinte hidroxilo, variando desde moléculas simples, como por exemplo os ácidos fenólicos, até estruturas altamente polimerizadas, como os taninos (**Tabela 1**) (Bravo, 2009).

Tabela 1 - Estruturas básicas de alguns compostos fenólicos.

Classe	Fórmula primária	Estrutura básica
Fenóis simples	C ₆	
Benzoquinonas	C ₆	
Ácidos fenólicos	C ₆ -C ₁	
Acetofenonas	C ₆ -C ₂	
Ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂	
Ácidos hidroxicinâmicos	C ₆ -C ₃	
Fenilpropenos	C ₆ -C ₃	

Cumarinas	C_6-C_3	
Cromonas	C_6-C_3	
Naftoquinonas	C_6-C_4	
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$	
Estilbenos	$C_6-C_2-C_6$	
Antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonoides	$C_6-C_3-C_6$	
Lignanas	$(C_6-C_3)_2$	

Elagitaninos



Relativamente à classificação destes compostos, um dos critérios mais comuns permite a sua distinção em flavonoides e não-flavonoides (**Figura 5**). A estrutura básica de um flavonoide consiste na combinação de dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de 3 carbonos (C₆-C₃-C₆), o que ocorre normalmente em associação com açúcares (derivados glicosídeos) ou proteínas (Del Rio et al., 2013).

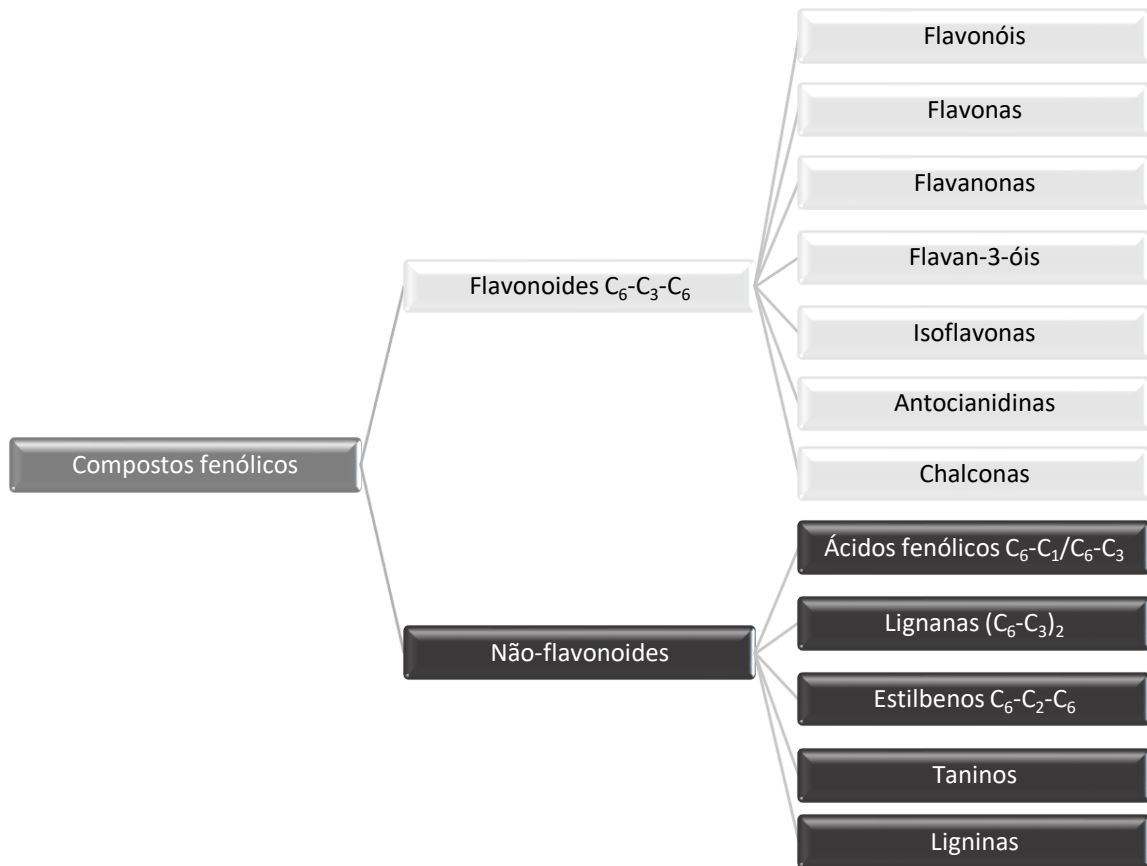


Figura 5- Classificação de compostos fenólicos.

A maior parte dos flavonoides ocorre sob a forma de compostos de baixo peso molecular entre as diferentes espécies de plantas, onde estes compostos são reconhecidos como sendo responsáveis pela cor e aroma das flores e frutos (Panche, Diwan & Chandra, 2016). De forma similar, os flavonoides protegem as plantas de fatores bióticos e abióticos e atuam como filtros UV, pela sua extraordinária capacidade de absorver a radiação UV deletéria (Takahashi & Ohnishi, 2005). Esta classe de compostos é considerada de elevada importância para a dieta humana, uma vez que os flavonoides não são sintetizados pelos mamíferos (Kozłowska & Szostak-Wegierek, 2014; Yao et al., 2004). Considerando a sua estrutura, as subclasses de flavonoides são determinadas essencialmente pelo carbono ao qual está ligado o anel B, bem como pelo grau de insaturação e oxidação do anel C (pirano) (**Figura 6**).

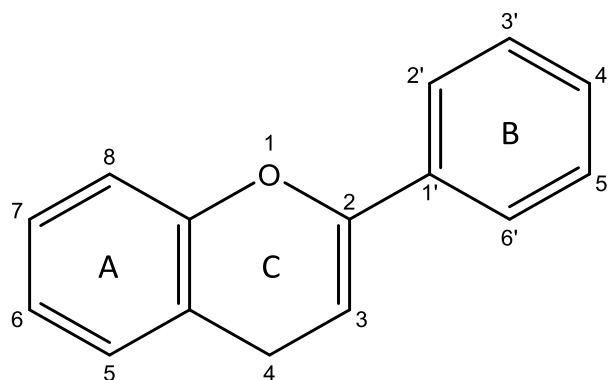
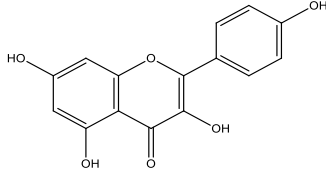
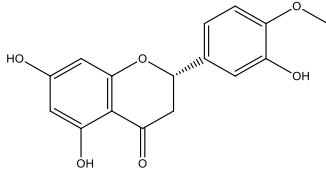
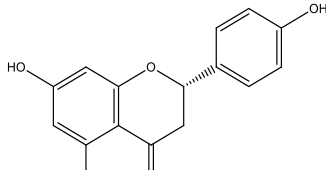
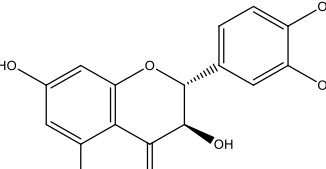
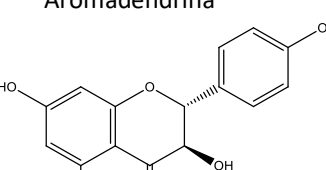
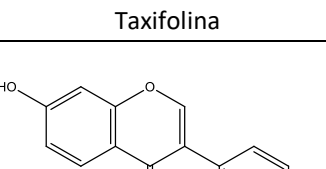
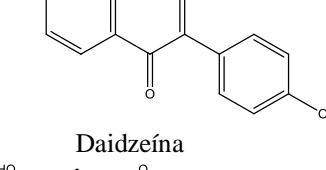
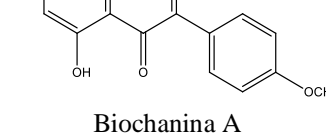


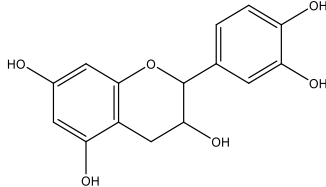
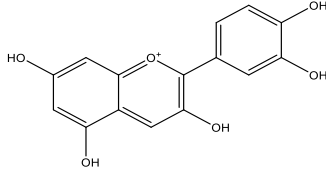
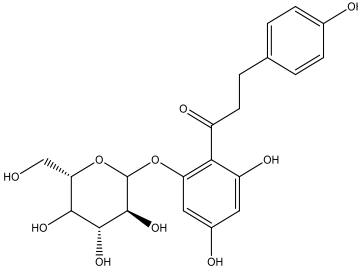
Figura 6 - Estrutura básica de um flavonoide.

Os flavonoides nos quais o anel B está ligado na posição 3 do anel C são designados como isoflavonas. Nos casos em que o anel B está ligado na posição 4, os compostos designam-se genericamente como neoflavonoides, enquanto os compostos em que o anel B se liga na posição 2 podem ser divididos em diferentes subgrupos dependendo das características estruturais do anel C (**Tabela 2**); estes subgrupos incluem flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, flavanóis ou catequinas, antocianinas e chalconas (Panche et al., 2016).

Tabela 2 - Ocorrência, efeitos fisiológicos, exemplos, e estrutura exemplificativa dos diferentes subgrupos de flavonoides.

Subgrupo	Ocorrência	Efeitos fisiológicos	Estruturas exemplificativas
Flavonas	Um dos grupos mais importantes. Presente em folhas, flores e frutos, normalmente glicosilados, em espécies como aipo, chicória, ou pimenta-verde.	Prevenção de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Jiang, Doseff & Grotewold, 2016)	<p>Apigenina</p> <p>Luteolina</p>
Flavonóis	Ocorrem abundantemente numa grande variedade de frutos e vegetais como brócolos, alho, ou cebola.	Atividade antioxidante, diminuição do risco de doenças cardiovasculares, propriedades anti-vasculares e anti-inflamatórias (Žugčič et al., 2019).	

Flavanonas	Presente geralmente em todos os citrinos, uva, orégãos.	Efeitos anti-hiperglicêmicos, antioxidantes (Annadurai et al., 2012); e cardioprotetores (Da Pozzo et al., 2017)	<p style="text-align: center;">Quercetina</p> 
			<p style="text-align: center;">Canferol</p> 
			<p style="text-align: center;">Hesperitina</p> 
			<p style="text-align: center;">Naringenina</p> 
Flavanonóis	Presente em diferentes frutos, vegetais, vinho, chá, ou café.	Propriedades antitumorais (Brusselmans, Vrolix, Verhoeven, & Swinnen, 2005; Luo, Jiang, King, & Chen, 2008), antiproliferativas, antioxidantes (Rogovskii et al., 2010) e antimicrobianas (J. An, Zuo, Hao, Wang, & Li, 2011)	<p style="text-align: center;">Aromadendrina</p> 
			<p style="text-align: center;">Taxifolina</p> 
Isoflavonoides	Presente com maior predominância nos grãos de soja e outras plantas leguminosas.	Fitoestrogênicos, neuroprotetores, anti-tumorais, anti-inflamatórios, antioxidantes, anti-hiperglicêmicos, hepatoprotetoras, antifibróticos (Miadoková, 2009; Raheja, Girdhar, Lather, & Pandita, 2018).	<p style="text-align: center;">Daidzeína</p> 
			<p style="text-align: center;">Biochanina A</p> 

Flavanóis, flavan-3-óis ou catequinas	Abundantes em vinho, chá, cacau, banana, maçã, uva, mirtilo, amora, pêssego e pera.	Potencial antioxidante, cardioprotetor, neuroprotetor, anti-hipertensivo, anti-diabético e modulador lipídico (Bernatova, 2018; Silvester, Aseer, & Yun, 2019).	 <p>Catequina</p>
Antocianidinas	Mirtilo, amora, ameixa, uva, framboesa, vinho tinto, cereja, morango, beterraba.	Propriedades antioxidantes, vaso-protetoras, anti-inflamatórias e anti-hipertensivas (Cassidy, 2018).	 <p>Cianidina</p>
Chalconas	Tomate, pera, maçã, morango e certos produtos contendo trigo.	Hepatoprotetoras (Karimi-Sales, Mohaddes, & Alipour, 2018), cardioprotetoras (Mahapatra & Bharti, 2016), e atividade anti-leishmaniose (de Mello et al., 2018).	 <p>Florizina</p>

A segunda classe de compostos fenólicos (metabólitos não-flavonoides) é um grupo estruturalmente heterogêneo, apesar de estar organizada em três subgrupos principais: ácidos fenólicos, lignanas (C₆-C₃)₂ e estilbenos C₆-C₂-C₆. Os ácidos fenólicos são ainda divididos em derivados hidroxibenzoicos (C₆-C₁) (**Figura 7**) e hidroxicinâmicos (C₆-C₃) (**Figura 8**). Além destes, existem ainda dois subgrupos que ocorrem naturalmente como polímeros complexos: os taninos e as ligninas (Del Rio et al., 2013).

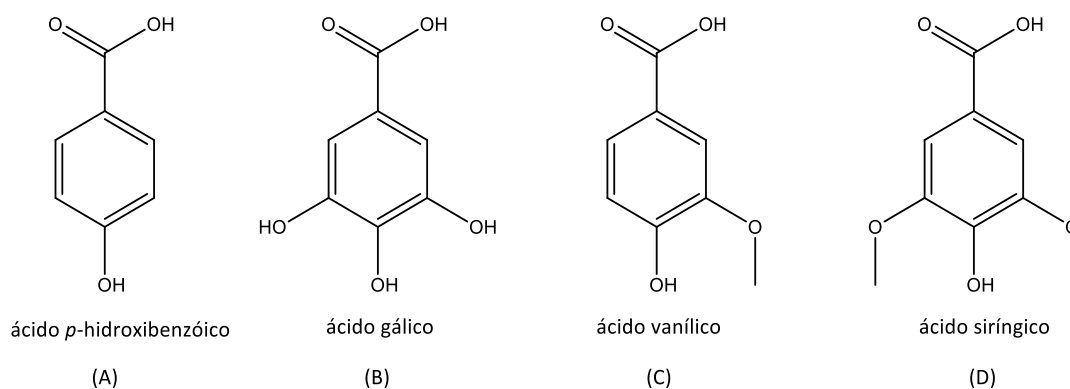


Figura 7- Estruturas químicas de alguns ácidos hidroxibenzoicos.

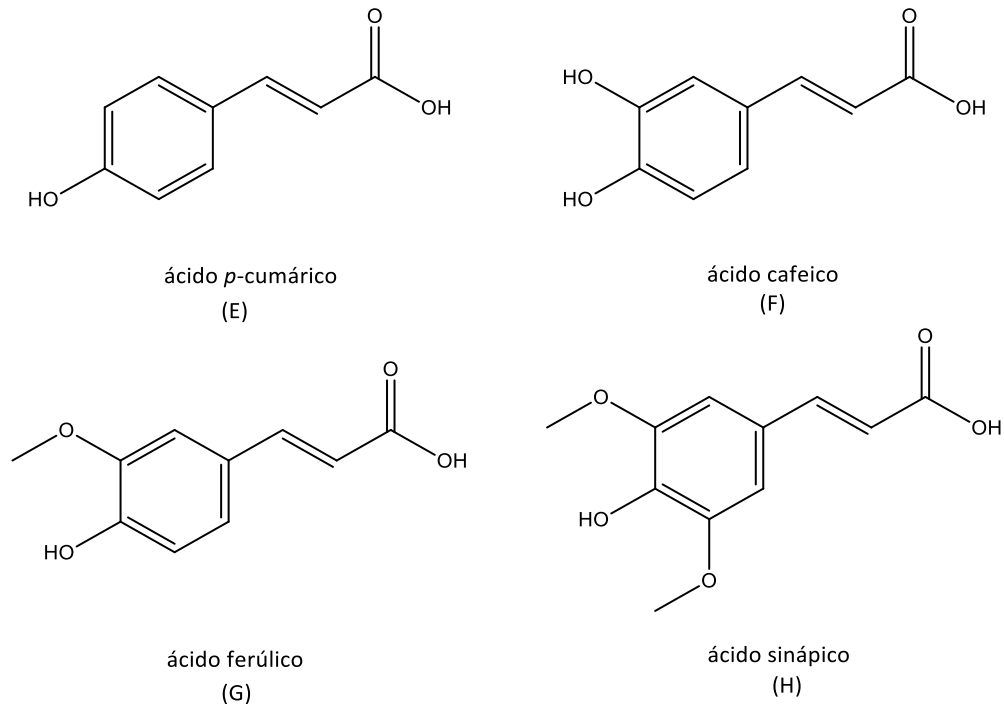


Figura 8 - Estruturas químicas de alguns ácidos hidroxicinâmicos.

Os não-flavonoides mais conhecidos são os ácidos fenólicos, um grupo de compostos muito disseminado nas plantas. Estes compostos desempenham atividades fundamentais ao crescimento e reprodução das plantas e a sua síntese é condicionada por fatores ambientais, como a luz, temperatura ou grau de poluição (Kefeli, Kalevitch, & Borsari, 2011).

Os ácidos hidroxibenzoicos encontram-se normalmente ligados à parede celular e são componentes típicos de estruturas complexas como as ligninas e os taninos hidrolisáveis. Também podem ser encontrados ligados a açúcares ou ácidos orgânicos. Os ácidos hidroxicinâmicos, de forma similar ao que se verifica com os ácidos hidroxibenzoicos, também ocorrem maioritariamente ligados a componentes estruturais da parede celular, tais como a celulose ou lignina, ou em complexos (estabelecidos através de ligações éster) com proteínas (Barros, Dueñas, Ferreira, Baptista, & Santos-Buelga, 2009). Um dos ácidos hidroxicinâmicos mais disseminado na natureza é o ácido cafeico, que pode ser encontrado em muitas espécies (*e.g.*, café, maçã, batata, espinafre, alface, azeite, ou uva (Mattila & Hellström, 2007).

1.4.2. Compostos fenólicos livres, esterificados e ligados à parede celular

Os compostos fenólicos podem ser encontrados nas plantas em três formas distintas: livres, esterificados ou em configurações insolúveis (ligados à parede celular). Apesar de na maior parte dos casos os compostos fenólicos se encontrarem livres ou conjugados com outras moléculas através de ligações éster, existem algumas espécies vegetais em que a percentagem de compostos ligados à parede celular apresenta valores bastante significativos (por exemplo, em cereais como o trigo, o sorgo ou a aveia, esta percentagem é superior a 75%) (Sun, Chu, Wu, & Liu, 2002).

Os compostos fenólicos insolúveis tendem a formar ligações covalentes com os componentes estruturais da parede celular, como por exemplo, celulose, hemicelulose, lignina, pectina e proteínas (**Figura 9**). O tipo de ligação depende do grupo funcional do composto fenólico e do componente estrutural; por exemplo, entre os grupos hidroxilo dos anéis aromáticos e a lignina estabelecem-se ligações éter, enquanto entre os grupos carboxílicos e as proteínas ou hidratos de carbono estruturais são estabelecidas ligações éster (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Uribe, & Serna-Saldívar, 2014). Estes compostos fenólicos desempenham um importante papel na proteção da parede celular, pois fornecem, simultaneamente, uma barreira química e física contra ataque de microrganismo e animais (Liu, 2007).

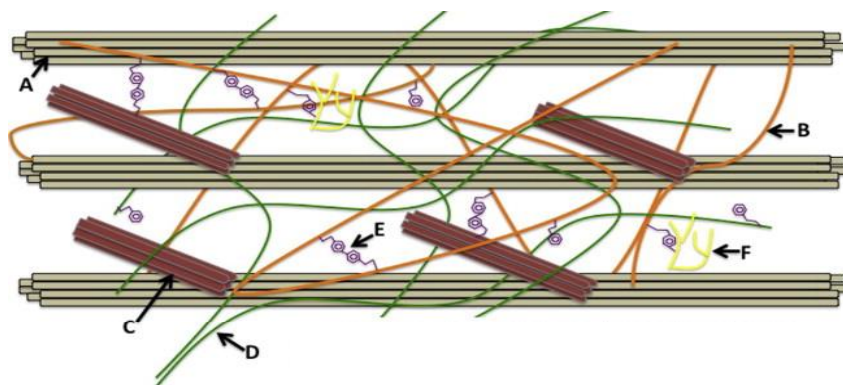


Figura 9 - Representação de uma secção da parede celular e das ligações estruturais entre os seus componentes e os compostos fenólicos. A: celulose; B: hemicelulose; C: proteína estrutural; D: pectina; E: ácido fenólico; F: lignina. **Fonte** - (Acosta-Estrada et al., 2014).

1.4.3 Compostos fenólicos em *Punica granatum* L.

Os fitoquímicos mais abundantes na romã são os compostos fenólicos, em particular um tipo de taninos hidrolisáveis designados como elagitaninos, que são formados a partir da ligação de um ácido elágico e um ácido gálico a um hidrato de carbono (estes elagitaninos são também comumente designados como punicalaginas) (Gómez-Caravaca et al., 2013). A cor vermelha do sumo de romã resulta da presença de antocianinas como a delphinidina, cianidina e pelargonidina, todas presentes na sua forma glicosilada (Hernández, Melgarejo, Tomás-Barberán, & Artés, 1999; Noda, Kaneyuki, Mori, & Packer, 2002). No total, foram já identificados mais de 150 compostos fenólicos na romã (Singh, Singh, Nripendra, Singh, & Ramajayam, 2010), incluindo, para além dos elagitaninos e das antocianinas, flavonóis (*e.g.*, quercetina), ácidos fenólicos (*e.g.*, ácido caféico, ácido clorogénico, ácido gálico, ácido *o*- e *p*-cumárico, ácido quínico) e ácido elágico (Fischer, Carle, & Kammerer, 2011; Gómez-Caravaca et al., 2013; Mena et al., 2012).

Contudo, é na casca da romã que se encontra a maior concentração de compostos fenólicos (essencialmente taninos, catequinas galocatequinas e prodelfinidinas), podendo esta conter até três vezes mais compostos fenólicos que o sumo (Gómez-Caravaca et al., 2013; Plumb, de Pascual-Teresa, Santos-Buelga, Rivas-Gonzalo, & Williamson, 2002). Uma percentagem relevante (30%) das antocianinas encontra-se na casca, sendo de destacar a cianidina-3,5-*O*-diglucósido, pelargonidina-3,5-*O*-diglucósido, pelargonidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-glucósido e a cianidina-3-*O*-rutínósido (Fischer et al., 2011). No entanto, e tal como acontece com outros frutos, o perfil fenólico varia de acordo com a cultivar e a etapa fenológica (Zhao, Yuan, Fang, Yin, & Feng, 2013). Ainda assim, as altas concentrações destes compostos indicam que os extratos obtidos a partir de cascas de romã podem ser considerados para aplicação em suplementos dietéticos ou conservantes alimentares (Chidambara Murthy, Jayaprakasha, & Singh, 2002; Li et al., 2006; Tehranifar, Selahvarzi, Kharrazi, & Bakhsh, 2011; Turgut, Soyer, & Işıklı, 2016).

Outro grupo de compostos com importância na romã são os taninos. Estes compostos são um dos produtos da biossíntese metabólica secundária das plantas, sendo caracterizados pela solubilidade em água, por possuírem massa molecular variando entre 500 e 5000 Daltons, e formarem precipitados na presença de proteínas e alcaloides (Harborne & Williams, 2000; Haslam, 2007). Tal como acontece com os restantes

compostos fenólicos, a concentração dos taninos presentes nas plantas varia de acordo com a condição fisiológica, idade, local no qual a planta é encontrada, solo, clima, entre outros (Serrano, Puupponen-Pimiä, Dauer, Aura, & Saura-Calixto, 2009). Os taninos possuem a característica de se complexarem com as proteínas, o que os torna em potenciais inibidores enzimáticos, podendo também interagir com hidratos de carbono, iões metálicos ou com a parede celular das bactérias, o que lhes confere atividade antimicrobiana (Gonçalves, Mateus, & de Freitas, 2011).

Os taninos são geralmente encontrados em formas hidrolisáveis ou condensadas (proantocianidinas). Os taninos hidrolisáveis apresentam uma estrutura química com um hidrato de carbono poliol (geralmente a D-glucose), complexado com ácido gálico e ácido elágico (**Figura 10**) (Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002). Na casca da romã, estes são os compostos fenólicos que merecem maior destaque. Na verdade, a concentração de alguns destes compostos fenólicos é de tal forma elevada, que o seu nome comum deriva do nome científico do fruto, tal como exemplificado pela punicalagina (**Figura 11**) e punicalanina (**Figura 12**) (Çam & Hişil, 2010; Yaich et al., 2017).

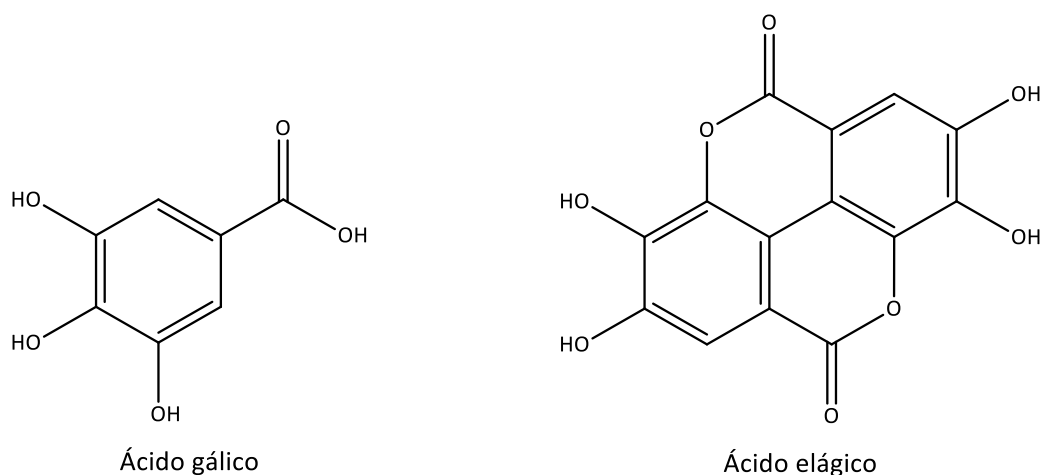


Figura 10 - Estrutura química do ácido gálico e ácido elágico.

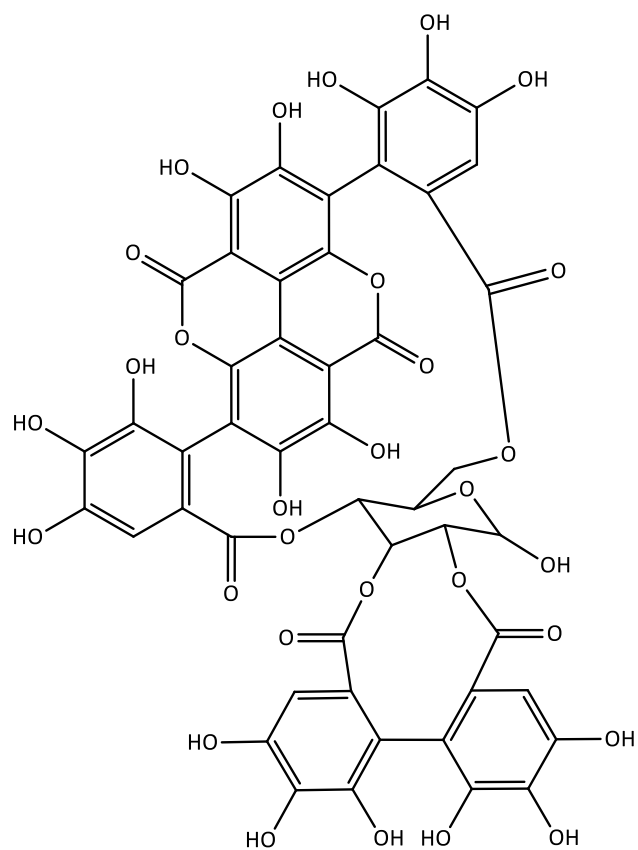


Figura 11- Estrutura química da punicalagina.

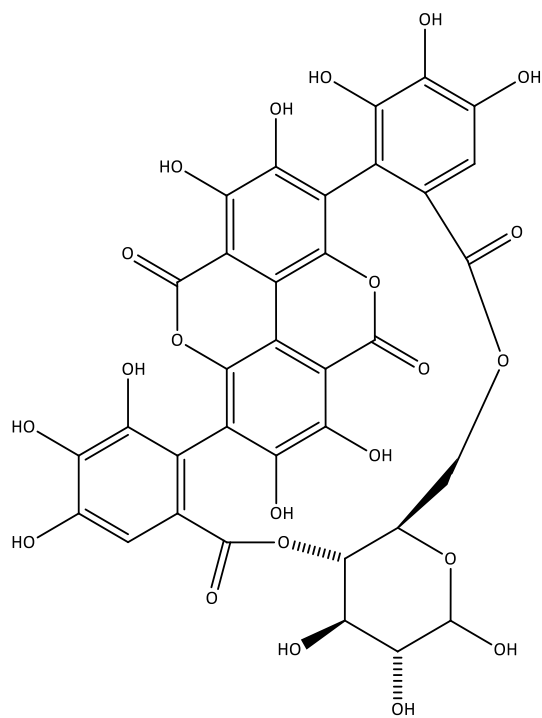


Figura 12- Estrutura química da punicalina.

Os elagitaninos encontram-se num número relativamente restrito de alimentos tais como framboesa, morango, castanha ou caju, para além de estarem presentes em partes não comestíveis das plantas como as folhas e cascas. Adicionalmente, estes compostos também podem ser encontrados em quantidades significantes em vinhos envelhecidos em barricas de carvalho, devido à difusão de compostos da madeira para o meio líquido (Clifford & Scalbert, 2000).

Por sua vez, os taninos condensados, caracterizam-se como sendo estruturas complexas resultantes da aglomeração de unidades básicas como a catequina e a epicatequina. Os subgrupos principais incluem prodelfinidinas, profisetinidinas e prorobinetidinas; no entanto, existem outros subgrupos como propelargonidinas, proteracacinidinas, ou proguibourtinidinas, diferindo no número de grupos hidroxilo que contêm. Apesar destas diferenças, todos os taninos condensados (à exceção dos oligómeros de leucoantocianidinas) derivam de oligómeros de poli-hidroxi-flavan-3-ol ligados através de ligações C-C entre os anéis A e os anéis pirano de diferentes unidades flavanol (Shirmohammadli, Efhamisisi, & Pizzi, 2018).

1.4.4 Bioatividade dos compostos fenólicos de *Punica granatum* L.

A bioatividade dos compostos fenólicos é explicada pelas suas propriedades químicas. Os compostos fenólicos são, por exemplo, substâncias fortemente antioxidantes, sendo reconhecidos pelo seu largo espectro de propriedades biológicas, o qual inclui também atividade anti-tumoral, antimicrobiana ou citotóxica. Alguns estudos mais específicos indicam mesmo uma associação entre dietas ricas em polifenóis e menores incidências de algumas doenças crónicas (Costa et al., 2017; Działo et al., 2016; Kaushik et al., 2015).

1.4.4.1 Atividade antioxidante

Apesar de já ser relativamente antiga, a definição de antioxidante ainda hoje aceita descreve os antioxidantes como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada com o agente oxidável, atrasa ou inibe a sua oxidação de maneira satisfatória” (Marx & Garg, 2002).

Outro conceito importante é o de radical livre, que de uma forma simples corresponde aos compostos orgânicos e inorgânicos que possuem elétrons de valência desemparelhados (Barry Halliwell, 2012). Os radicais livres possuem diferentes capacidades oxidativas. O anião superóxido (O_2^-), por exemplo, tem uma capacidade de oxidação baixa, contrariamente ao anião hidróxido (HO^-), que por outro lado apresenta pouca difusão (Anderson, 1996). No organismo, os radicais livres podem ser gerados durante os processos metabólicos e/ou por influência de fatores externos (*e.g.*, radiação ultravioleta, poluição, consumo de tabaco, ou dieta inadequada) (Kandola, Bowman, & Birch-Machin, 2015), dependendo a sua concentração da eficiência que os agentes antioxidantes têm em neutralizá-los (Finkel, 2003).

Sempre que se verifica um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (em favor dos oxidantes), o risco de dano celular é maior, sendo esse estado designado como stress oxidativo (Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum, & Kalayci, 2012).

No caso dos compostos fenólicos, a atividade antioxidante está associada, entre outros fatores, com a sua capacidade para neutralizar radicais livres (estabilizando-os por deslocalização) devido à interação dos grupos hidroxilos com os elétrons-p do anel benzénico. A formação destes radicais relativamente estáveis modula os processos de oxidação mediados por radicais, representando um importante fator da sua atividade como antioxidantes. Assim, os compostos fenólicos com grupos hidroxilo em posições *orto* são antioxidantes fortes, mas são também relativamente instáveis, podendo ser oxidados a quinonas durante as etapas de processamento dos alimentos ou o seu armazenamento (Parr & Bolwell, 2000).

Outra importante propriedade química é exemplificada pela capacidade dos compostos fenólicos para quelatar iões metálicos. Neste caso, a presença de grupos hidroxilas vicinais, tal como observado por exemplo na quercetina ou no ácido cafeico é essencial. Esta capacidade de ligação a metais é, uma vez mais, relevante para a atividade antioxidante, em particular porque os iões livres de metais de transição atuam como pro-

oxidantes capazes de produzir radicais livres na presença de peróxido de hidrogénio (Croft, 1998; Psotová, Lasovský, & Vicar, 2003).

Independentemente do mecanismo, os antioxidantes podem contribuir para a proteção de células e tecidos. Deste modo, os alimentos ricos em antioxidantes devem integrar as dietas em quantidades significativas, auxiliando na prevenção de diferentes doenças (*e.g.*, cardíacas, neurodegenerativas ou cancerígenas) (Skrovankova, Sumczynski, Mlcek, Jurikova, & Sochor, 2015).

Desta forma, a utilização de antioxidantes como aditivos na indústria alimentar é muito importante, uma vez que estes compostos conferem ao alimento maiores períodos de conservação devido à sua ação neutralizadora dos radicais livres que de outra forma alterariam as propriedades do alimento (Halliwell, Aeschbach, Löliger & Aruoma, 1995).

1.4.4.2 Propriedades anti-tumoral e citotóxica

Segundo a GLOBOCON, em 2018 cerca de 4,23 milhões de pessoas na Europa foram diagnosticadas com cancro, quando se analisa em escala global, este número aumenta para 18,1 milhões de pessoas. Os tratamentos disponíveis atualmente, como a quimioterapia, apresentam uma resposta pouco satisfatória, geram grandes efeitos colaterais, e em alguns casos a doença pode ressurgir devido à resistência que o cancro desenvolveu ao tratamento (Pasculescu et al., 2016; Monisha et al., 2016). Assim, o desenvolvimento de produtos não-tóxicos, de fácil acesso e que possuam um elevado desempenho na prevenção desta doença tornam-se extremamente relevante (Bordoloi et al., 2015).

Estudos recentes relatam que uma dieta abundante em frutas e vegetais, ricos em polifenóis, auxiliam na ação preventiva contra o cancro (Kunnumakkara et al., 2015). Os polifenóis e flavonoides normalmente encontrados em vegetais, estão descritos na literatura como capazes de controlar, de forma inibidora, a expressão de uma série de genes, proteínas e sinalizadores em cascata que associados ao crescimento e desenvolvimento de tumores, o que os torna potenciais agentes terapêuticos para pacientes com cancro (Ko et al., 2017; Reza et al., 2011; Turrini, Ferruzzi, & Fimognari, 2015).

1.4.4.3. Atividade antimicrobiana

Uma das funções dos compostos fenólicos nas plantas está relacionada com a proteção contra microrganismos patogênicos, tais como fungos, bactérias ou vírus, o que pode indicar a sua utilização em seres humanos com objetivos similares (Fialova, Rendekova, Mucaji, & Slobodnikova, 2017). Além disso, e tendo em conta o problema do aparecimento de estirpes multi-resistentes, a pesquisa de novos agentes ativos é de extrema importância. A utilização de compostos fenólicos parece constituir uma abordagem eficiente para resolver este problema, uma vez que estes compostos têm vindo a demonstrar uma atividade antimicrobiana significativa, mesmo em estirpes resistentes a antibióticos (Anani et al., 2015; Pinho et al., 2014; Zuk et al., 2014), a qual deverá resultar dos seus mecanismos de ação sobre a parede celular das bactérias (Wu et al., 2013).

Devido ao aumento exponencial e preocupante de bactérias com resistência a antibióticos, a procura por compostos de origem vegetal com capacidade de controle do crescimento microbiano tornou-se uma questão mais relevante (Cihalova et al., 2015).

1.4.5 Extração de compostos bioativos

A utilização bem-sucedida de uma determinada matriz natural como fonte de compostos bioativos depende em grande medida da adequabilidade da metodologia de extração selecionada, que deverá ser eficiente e preservar a integridade dos compostos a extrair (González-Montelongo, Lobo, & González, 2010). Para além do controlo dos parâmetros operacionais, é também essencial que se apliquem processos passíveis de ser adaptados à escala industrial, sem perdas significativas de rendimento (Lu et al., 2007).

Um dos processos de extração mais simples, designado comumente como maceração ou lixiviação, implica a utilização de um solvente líquido adequado às características estruturais dos compostos a extrair da fase sólida, sendo a seleção do solvente feita também com base no critério da polaridade (Pellegrini et al., 2007).

Também o tempo de extração é um fator fundamental, apresentado grandes variações de acordo com o composto a ser extraído, tal como foi descrito para o ácido gálico, ácido elágico e punicalagina A e B, cujos rendimentos individuais demonstraram depender em grande extensão do tempo de extração aplicado (Qu, Breksa, Pan, & Ma, 2012).

Alguns tipos de extração, genericamente designados como convencionais, seguem metodologias bastante simples, tal como verificado na extração sólido-líquido (Jurinjak Tušek et al., 2016), extração líquido-líquido (Fang et al., 2017) ou extração por Soxhlet. Além destas, têm vindo a ser testadas outras metodologias, ditas não-convencionais, tais como:

- a) Extração com fluídos (normalmente dióxido de carbono) em condições supercríticas (Filip et al., 2016; Pavlić et al., 2018);
- b) Extração com água em condições sub-críticas (Gilbert-López, Plaza, Mendiola, Ibáñez, & Herrero, 2017; Nastić et al., 2018; Y. Wang et al., 2018) com auxílio de líquidos iónicos (Vo Dinh, Saravana, Woo, & Chun, 2018);
- c) Extração assistida por micro-ondas (Xu, Yu, Wang, Xu, & Liu, 2018);
- d) Extração assistida por ultrassons (Xi, He, & Yan, 2017a).

Entre outras metodologias de extração, a casca de romã foi também já utilizada em:

- a) Ensaio de extração com dióxido de carbono em condições supercríticas assistida por enzimas, nos quais se verificou um aumento do rendimento em compostos fenólicos, com particular para os ácidos fenólicos (Mushtaq, Sultana, Anwar, Adnan, & Rizvi, 2015).
- b) Extração assistida por ultrassons, que tem a vantagem de ser efetuada a temperaturas mais baixas, respeitando a termo-sensibilidade dos compostos fenólicos. Adicionalmente, esta metodologia requer menos energia e permite melhores rendimentos do que os métodos de extração convencionais (Kazemi, Karim, Mirhosseini, & Abdul Hamid, 2016).
- c) Extração com recurso a pulsos elétricos de alta voltagem, que permitiram aumentos de cerca de 25% de rendimento quando comparados com os obtidos pelo método de maceração simples utilizando água quente (Xi, He, & Yan, 2017b).

1.5. Pectina

“Pectina” deriva do grego *pektikos* e significa congelar ou solidificar e foi utilizado pela primeira vez em 1825 por Braconnot. A pectina consiste basicamente num polímero com unidades de α -ácido galacturônico, com um número variável de grupos éster metil (Liu et al., 2006). São biossintetizadas no complexo de golgi das células vegetais e liberadas no interior da parede celular por exocitose, de forma a conferir maior resistência e flexibilidade à parede, separando as microfibras e ligando as células adjacentes da lamela média (Braidwood et al., 2014)(**Figura 13**). A literatura refere que as maiores concentrações são encontradas em plantas, frutas e vegetais jovens (De Assis et al., 2001).

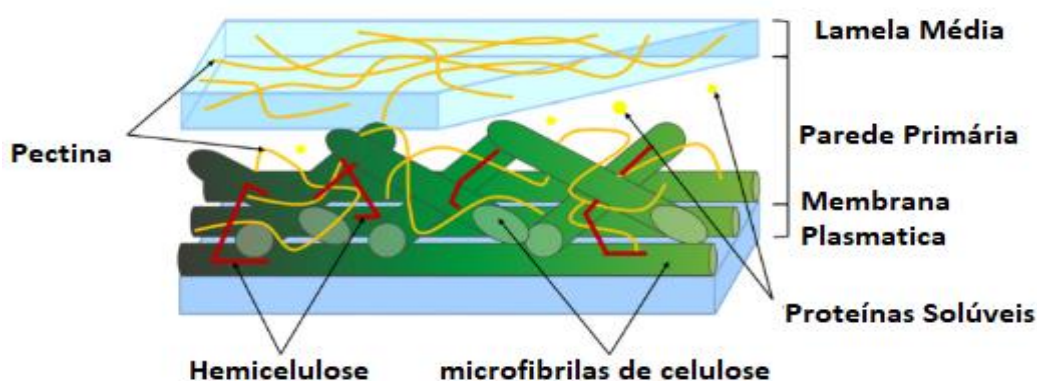


Figura 13 - Estrutura da Parede Celular. Fonte - (Sticklen, 2008)

A pectina tem vindo a ser utilizada pela indústria alimentar como agente gelificante, emulsificante, estabilizante e/ou espessante (Codex Alimentarius, 1995). É definida como um composto hidrocolóide capaz de formar uma estrutura que aprisiona água causando a formação de um gel mesmo em concentrações inferiores a 1% (Attia et al., 2016; Chan et al., 2016; Liang et al., 2012). Habitualmente a pectina é extraída, para fins comerciais da cascas de frutos cítricos e maçã (Willats et al., 2006), no entanto alguns estudos recentes demonstram a possibilidade de se extrair pectina de diversas fontes vegetais nomeadamente, de cascas da romã (Pereira et al., 2016), banana (Mazzetto et al., 2015) ou manga (Parniakov et al., 2016).

Atualmente, a empregabilidade da pectina pela indústria alimentar é extremamente vasta, sendo utilizada na produção de gelados com baixo teor de gordura (Pereira et al., 2016), como estabilizante para nanoemulsões (Mungure et al., 2018), como espessante em

geleias (Yuliarti et al., 2017) e, como estabilizante em bebidas protéicas (Wagoner; Foegeding, 2017), entre outros. Adicionalmente, a literatura atribui-lhe características benéficas para a saúde do consumidor tais como, atuar na redução dos níveis de colesterol (Gunness; Gidley, 2010), imunomodulação (Merheb et al., 2019), ou como prébiotico (Wang et al., 2017). Devido ao facto de não possuírem toxicidade e terem um baixo custo para produção, tem vindo a despertar interesse nas mais diferentes áreas tais como, produção de *drug deliverys* (Marras-Marquez et al., 2015), indústria farmacêutica (Günter; Popeyko, 2016), cosmética (Lupi et al., 2015) e de polímeros (Da Costa et al., 2016).

1.5.1 Estrutura química da pectina

A determinação da estrutura da pectina é um processo de alta complexidade, pois podem ocorrer alterações durante o processo de extração da matriz vegetal, durante o processamento e armazenamento. As pectinas possuem uma complexa estrutura de biopolímeros. Tal heterogeneidade é notável entre as plantas, tecidos e até entre células do mesmo organismo vegetal. É constituída principalmente de polímeros de D-ácido galacturônico, que tem sua estrutura representada na **Figura 14**, contendo quantidades significativas de L-raminose, D-arabinose, D-galactose, e uma série de outros diferentes monossacáridos (Fissore et al., 2012).

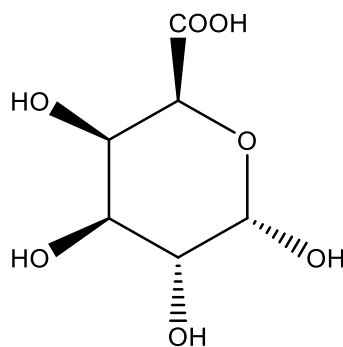


Figura 14 - Ácido galacturônico. Principal monômero das pectinas

Os principais polissacarídeos da pectina são: homogalacturonana (HGA), rhamnogalacturonana I (RG-I) e rhamnogalacturonana II (RG-II). A HGA é o composto mais relevante entre os polissacarídeos da pectina, correspondendo a cerca de 65% da

estrutura da pectina, a RG-I corresponde a cerca de 20-35% e o restante é composto por substituintes da galacturôna. (Mohnen, 2008; Munarin et al., 2012; Sriamornsak, 2003).

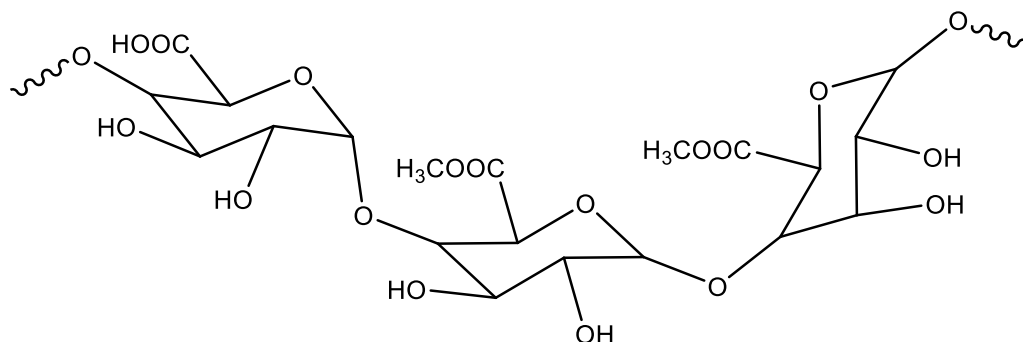


Figura 15 – Homogalacturonana (HGA). Ácido galacturônico com ligação glicosídica (1,4).

O HGA é formado por D-ácido galacturônico (AGal) por meio de ligações glicosídicas α -1,4. O HGA é determinado por meio da origem botânica, localização da pectina na estrutura vegetal, clima, e método de extração, sendo os grupos C-6 carboxílicos do HGA altamente ou parcialmente esterificados com metanol (Fissore et al., 2012; Koubala et al., 2014).

A pectina disponível para comercialização possui alta heterogeneidade, assim, criou-se uma classificação com base no teor de metil-esterificação ou teor de metilação (degree of methylation, DM) das unidades de AGal. O DM expressa a razão entre metil-esterificado e o total de unidades AGal existentes, quando o valor do DM é superior a 50% classifica-se como high-methoxy (HM), quando a proporção varia entre 5 a 50% a pectina é classificada como low-methoxy (LM) (Jeantet et al., 2016 e May, 1990).

1.5.2. Características da pectina

O método de extração utilizado possui grande influência nas características da pectina, nomeadamente na sua solubilidade, viscosidade e capacidade de formar gel. A solubilidade da pectina é determinada pelo grau de metilação, peso molecular, e os contra íons presentes na solução, temperatura e pH (McCann; Roberts, 1996; Sriamornsak, 2003). Quanto maior o grau de metilação, maior será a solubilização, contudo, quanto maior a cadeia do polímero menor a solubilidade (Sila et al., 2009). Na presença de um ácido fraco e em condições neutras, um aumento da temperatura pode desencadear condições propícias

para a degradação da pectina e uma mudança na solubilidade resultada da reação de β -eliminação. Essa reação de eliminação está correlacionada com a ruptura da ligação glicosídica no C-4 e a remoção de um átomo de hidrogênio no C-5 do ácido galacturônico (Diaz et al.,2007; Keijbets & Pilnik, 1974).

Por sua vez, o aumento da viscosidade das soluções de pectina está diretamente relacionado com a sua solubilidade. O aumento da concentração de pectina nas soluções pode resultar numa diminuição na distância intermolecular levando ao aumento das interações moleculares, como a ponte de hidrogênio. A energia cinética tende a aumentar com a elevação da temperatura, cominando no aumento da distância intermolecular, gerando por fim, uma diminuição da viscosidade (Kar & Arslan, 1999).

A capacidade de formação de gel está vinculada com a estrutura da pectina entre outros fatores, como concentração de açúcar, e a presença de agentes de reticulação, temperatura e pH. A organização estrutural das pectinas está correlacionada com o grau de metilação, peso molecular e heterogeneidade da cadeia polimérica (BeMiller, 2009). O processo de gelificação ocorre em uma estrutura de três dimensões no qual a água é aprisionada e cria-se um soluto da união dessas duas moléculas (Willats et al.,2006).

2. Objetivos

Este trabalho pretendeu testar diferentes solventes de extração na obtenção de compostos fenólicos de interesse a partir de cascas de duas variedades de romã (Purple Queen e Mollar de Elche) de forma a garantir o aproveitamento de um biorresíduo com potencial de aplicação na indústria alimentar. O plano de trabalho encontra-se esquematizado na **Figura 15**, cujos objetivos específicos são:

- i) Extração de compostos a partir de ambas as cascas em análise recorrendo a diferentes solventes de extração (Etanol; Etanol:Água (50:50) e Água);
- ii) Caracterização e quantificação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos e a um detetor de espectrometria de massa com uma fonte de ionização por espalhamento de eletrões (HPLC-DAD-ESI/MS);
- iii) Extração da pectina a partir das cascas de ambas as variedades de romã.
- iv) Avaliação de diferentes propriedades bioativas das cascas:
 - Potencial antioxidante recorrendo ao ensaio de inibição da peroxidação lipídica (TBARS- espécies reativas do ácido tiobarbitúrico- em homogeneizados cerebrais);
 - Potencial citotóxico em linhas celulares tumorais humanas (carcinoma hepatocelular - HepG2, cervical - HeLa, pulmão - NCI-H460 e mama - MCF-7) e em culturas primárias de células de fígado de porco (não tumorais- PLP2), pelo método da sulforrodamina B (SRB).
 - Atividade antibacteriana avaliada pelo método de microdiluição com o corante INT (cloreto de iodonitrotetrazólio)
- v) Incorporação do melhor extrato obtido num produto de pastelaria típico do Brasil, casadinhos, e avaliação dos efeitos dessa mesma incorporação nos parâmetros físicos (cor e textura), perfil nutricional, composição química e atividade antioxidante, comparativamente ao produto original.

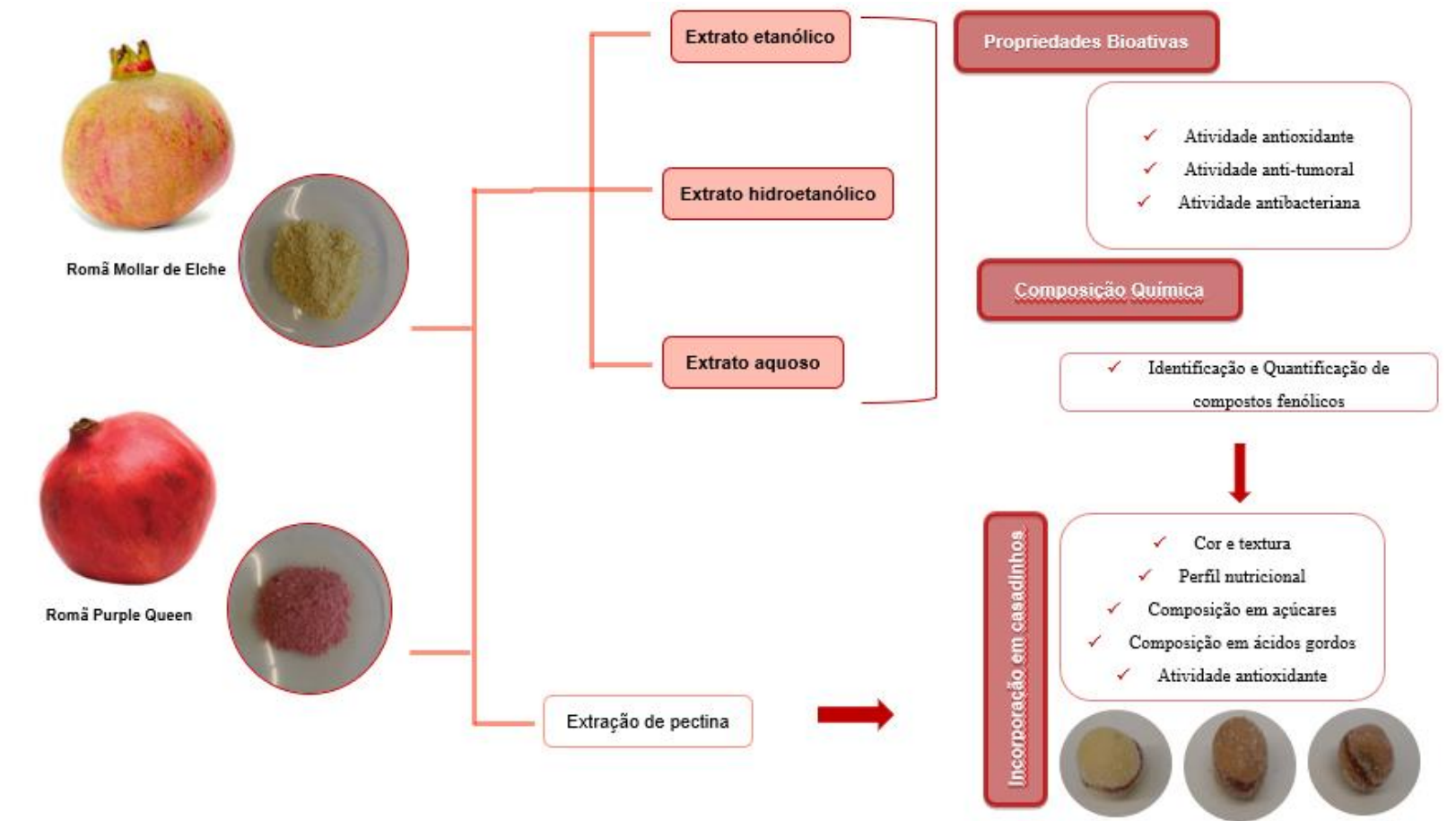


Figura 16 - Representação esquemática dos objetivos do presente trabalho.

3. Metodologia

3.1 Preparação das amostras

Os frutos de Mollar de Elche e Purple Queen foram adquiridas num comercio local em outubro de 2018. As cascas foram finamente separadas da polpa e após congeladas foram desidratadas por liofilização (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EU.) De seguida, as amostras foram trituradas e o pó misturado para garantir a homogeneidade das amostras e, foram armazenadas num local fresco e seco ao abrigo de luz, para posteriores análises.

3.2 Reagentes

Os solventes *n*-hexano 95%, acetonitrilo 99% e acetato de etilo 99,98%, de grau HPLC, foram adquiridos na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal) e o solvente metanol de grau analítico, foi adquirido na Pronalab (Lisboa, Portugal). Os restantes solventes usados, igualmente de grau analítico foram os seguintes: éter etílico (Lab-Scan); tolueno e ácido sulfúrico (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, EUA). A água foi tratada previamente à sua utilização pelo sistema de purificação Milli-Q-Water (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, EUA).

Os padrões dos compostos fenólicos utilizados foram adquiridos pela Sigma-Aldrich, Extrasynthese e Polyphenols.

O sêrum fetal de bovino (SFB), a L-glutamina, a solução salina de Hank's (HBSS), a solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL, respetivamente) e o meio DMEM (meio de cultura para células animais (*Dulbecco Modified Eagle*)) foram adquiridos na empresa Hyclone (Logan, Utah, EUA). O ácido acético, elipticina, sulforodamina B (SRB), ácido tricloroacético (TCA) e Tris foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

O Mueller-Hinton agar (MHB) foi obtido na Biolab® (Hungria). O composto *p*-Iodonitrotetrazolium chloride (INT) foi adquirido da Panreac Applichem (Barcelona, Espanha). Os antibióticos imipenem e vancomicina foram obtidos da Hikma farmacêutica (Portugal SA) e a Ampicilina da Janssen farmacêutica (Bélgica).

3.3 Extração de compostos fenólicos

As amostras liofilizadas (1g) foram submetidas a maceração com a utilização de três solventes distintos: água, solução de etanol/água (50:50, *v/v*) e etanol, sendo utilizado 30mL de solvente, à temperatura ambiente, com agitação magnética (150 *rpm*) durante 1 hora. O processo de extração foi realizado de forma individual para cada solvente. Posteriormente, foi filtrada através de um papel de filtro (Whatman No. 4) e o processo foi repetido, sendo a amostra reextraída com 30 mL da respectiva solução utilizada inicialmente. Por fim, a fração alcoólica dos extratos obtidos foi evaporada a pressão reduzida (evaporador rotativo, Büchi R-210, Flawil, Suíça) e liofilizados (47 °C, 0.045 bar; FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA) para posteriores análises.

3.4 Determinação de compostos fenólicos

Para a análise do perfil fenólico, o extrato descrito, foi redissolvido numa concentração de 10 mg/mL com EtOH/H₂O (20:80, *v/v*).

Para a análise cromatográfica foi utilizado um sistema integrado com uma bomba quaternária e um detetor de díodos (DAD) com dupla detecção *online* (comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm) acoplado com um sistema de processamento de dados HP Chem Station. O sistema de HPLC é equipado com uma bomba (Knauer, Sistema Smartline 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco, Easton, Maryland, EUA) e um detetor de índice de refração (Knauer Smartline 2300). A separação cromatográfica foi obtida através de uma coluna Eurospher 100-5 NH₂ (4.6 x 250 mm, 5 mm, Knauer), que operou a uma temperatura de 30 °C (7971 R Grace). Como fase móvel foi usado acetonitrilo/água desionizada (70:30; *v/v*) com um caudal de 1 mL/min. Para a identificação dos compostos, recorreu-se ao software Clarity 2.4 Software (DataApex), a partir do qual se compararam os tempos de retenção relativos dos picos da amostra, com padrões conhecidos.

Relativamente à análise MS, foi realizada num espectrómetro de massa de sistema Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, São José, Califórnia, EUA), o qual se encontrava equipado com uma fonte de ionização Electrospray (ESI) num analisador de massa de armadilha de ião-quadrupolo tripla, controlada pelo software Analyst 5.1.

Para a identificação dos compostos procedeu-se à comparação dos dados obtidos (tempos de retenção, espectros UV-Vis e espectros de massa) com dados disponíveis na literatura e, quando disponíveis, com os padrões.

Nos casos em que não se verificou disponibilidade de padrões para os respetivos compostos, a quantificação foi feita através de curvas de calibração de compostos do mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg de composto por g de extrato.

3.5 Avaliação das propriedades bioativas da casca da romã

3.5.1 Atividade antioxidante

Para o ensaio da inibição da peroxidação lipídica utilizando substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada uma porção de cérebro de porco, à qual foi adicionado tampão tris-HCl (20 mM, pH=7,4), homogeneizado e centrifugado (10 min; 3500 g).

Aos extratos de diferentes concentrações, contido nos tubos de ensaio (200 µL), foram adicionados 100 µL de ácido ascórbico, 100 µL de sulfato de ferro e 100 µL de sobrenadante da suspensão de cérebro.

Os tubos foram colocados num banho a 37 °C durante 1 hora, ao fim da qual foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético (28%) e 380 µL de ácido tiobarbitúrico (2%).

Seguidamente, os tubos foram encubados a 80 °C, durante 20 minutos, após os quais foram centrifugados e medida a absorvância do sobrenadante a 532 nm (Barros, Oliveira, Carvalho, & Ferreira, 2010). Os resultados são apresentados em valores de Ec_{50} que representa a concentração de amostra que fornece 50% de atividade antioxidante.

3.5.2 Atividade antibacteriana

A atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada recorrendo ao método colorimétrico de microdiluição usando o corante cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT), de acordo com o procedimento descrito por Pires et al. (2018).

Os microrganismos utilizados foram isolados clínicos obtidos de pacientes hospitalizados em diferentes departamentos no Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro Vila Real, Norte de Portugal. Para a realização do ensaio, foram utilizadas 5 estirpes

de bactérias Gram Negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*), 3 estirpes de bactérias Gram Positivas (*MRSA*- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*).

Para a realização do ensaio, inicialmente redissolveu-se o extrato numa solução com 5% de DMSO e 95% de meio de cultura), obtendo-se uma solução mãe com uma concentração de 100 mg/mL. A cada um dos 96 poços da microplaca, **Figura 17**, adicionaram-se 150 µL de meio de cultura MHB (Muller Hinton Broth) a 40 µL de solução inicial (solução mãe). A partir desta, fizeram-se diluições sucessivas, obtendo-se concentrações de 20 mg/mL a 0,156 mg/mL.

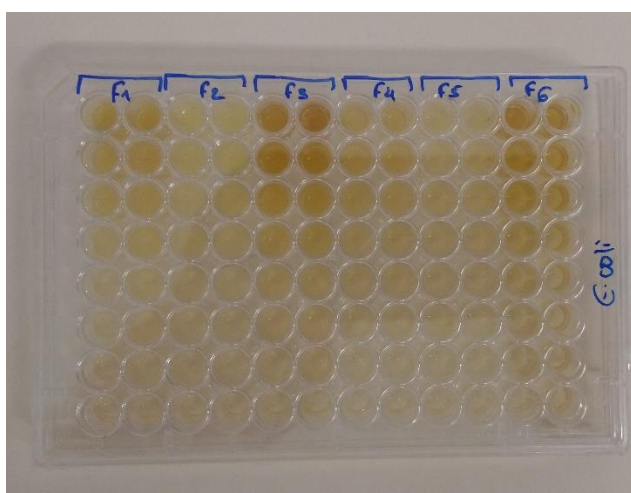


Figura 17 - Microplaca para análise inibição da *E. coli*.

Relativamente a cada estirpe de bactéria, estas prepararam-se recorrendo à leitura da densidade ótica (espectrofotómetro SHIMADZU UV-120-01) e posterior ajuste para 0,50 nm, pela escala de McFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. De seguida, adicionou-se 10 µL dos mesmos inóculos bacterianos a cada poço e as placas foram incubadas na estufa (Jouan, Berlim, Alemanha) a uma temperatura de 37 °C, durante 24 horas.

Os resultados foram expressos em valores de CMI (concentração mínima inibitória), definida como sendo a menor concentração de extrato para inibir o crescimento microbiano; e também CMB (concentração mínima bactericida), definida como sendo a menor concentração de extrato necessária para matar um microrganismo. Ambos os valores são expressos em mg/mL.

Também a presença ou ausência de turbidez do meio, denuncia a proliferação celular ou ausência desta, respetivamente. Neste sentido, foi adicionado o composto INT (0,2 mg/mL; 40 µL) a cada poço da microplaca, incubando-se a 37 °C por 30 minutos. Este ensaio permite analisar a viabilidade celular e, conseqüentemente, a potencialidade antimicrobiana do extrato: caso houvesse alteração da coloração da solução de incolor para cor de rosa, significava que as bactérias se encontravam viáveis e o extrato não foi eficaz contra esta; contrariamente, se a solução se mantivesse incolor, o extrato foi eficaz e inibiu a proliferação celular.

Além das preparações para avaliação da atividade, foram ainda preparados 2 controlos, 1 negativo e outro positivo. Como controlo negativo (ausência de atividade por parte das bactérias) utilizaram-se antibióticos, sendo que, para bactérias Gram negativas recorreu-se à Ampicilina (20 mg/mL) e ao Imipenem (1 mg/mL), enquanto que, para bactérias Gram positivas utilizou-se Ampicilina (20 mg/mL); já como controlo positivo (presença de atividade por parte das bactérias) utilizou-se uma solução de meio juntamente com inóculo de bactéria.

3.5.2 Avaliação da atividade antitumoral

O efeito dos extratos no crescimento de linhas celulares tumorais humanas foi avaliado através do ensaio da Sulfarodamina B (SRB), a fim de determinar a inibição do crescimento celular. Para tal foram utilizadas 4 linhas celulares tumorais: MCF-7 (carcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular).

As células foram mantidas como culturas aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% **heat-inactivated FBS** (MCF-7 e NCI-H460) ou em DMEM suplementado com 10% FBS, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL streptomina (células HeLa e HepG2), a 37 °C numa incubadora com ar humidificado e 5% CO₂.

Cada linha celular foi preparada à densidade apropriada (1.0×10^4 células/poço) em placas de 96 poços e deixadas a aderir durante 24h. Após esse tempo as células foram testadas por 48h com várias concentrações dos extratos.

Após o período de incubação, as células aderentes foram fixadas adicionando ácido tricloroacético 10% frio (TCA, 100 µL) e deixadas a repousar durante 60 min a 4 °C. As

placas foram depois lavadas com água desionizada e secas. A cada poço foram adicionados 100 µL da solução SRB (0.1% em 1% de ácido acético) e as placas foram deixadas a incubar à temperatura ambiente, por 30 min. A SRB em excesso foi removida lavando as placas com ácido acético 1% e foram deixadas a secar ao ar. Depois a SRB ligada foi solubilizada com 10 mM Tris (200 µL) e a absorvância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas (Biotek Elx800).

As curvas de dose-resposta foram obtidas para cada extrato e linha celular testadas. Foi também calculado o valor de GI₅₀ que corresponde à concentração de extrato que inibe 50% do crescimento celular (Vichai & Kirtikara, 2006; Abreu et al., 2011). Como controlo positivo foi utilizada a Elipticina.

Para as células não tumorais foi preparada uma cultura celular, a partir de fígado de porco obtido no matadouro local, que foi designada de PLP2. O tecido de fígado foi lavado com Hank's balanced salt solution contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomicina e dividido em 3 explantes de 1×1 mm.

Alguns destes explantes foram colocados em frascos de tecido de 25 cm², com meio DMEM suplementado com sêrum fetal de bovino 10%, 2mM de aminoácidos não essenciais e 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e incubados a 37 °C com atmosfera humidificada e 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 2 dias.

O cultivo das células foi continuado com monitorização direta a cada 2 ou 3 dias utilizando um microscópio de contraste de fases.

Posteriormente foi feita uma subcultura de células e estas foram colocadas em placas de 96 poços com a densidade de 1.0 x10⁴ células/poço e cultivadas em meio DMEM com FBS 10%, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Abreu et al., 2011).

3.6. Extração Pectina

A pectina foi obtida por extração com água, seguindo um procedimento descrito por Miceli-Garcia (2014). Foram realizadas duas extrações a diferentes pHs de forma a ser possível a comparação de rendimentos. Para cada extração, foram misturadas 10g de da casca da romã liofilizada em pó com 40 mL de água destilada, e após agitação intensa foram adicionados mais 40 mL de água destilada sob agitação. Para uma das extrações o pH foi ajustado (Hanna Instruments, Microprocessor pH meter 211, Uk) com ácido

clorídrico até aproximadamente 1,5; para a outra extração confirmou-se apresentar um pH de aproximadamente 3. A mistura colocada sob uma placa de aquecimento até atingir 90°C sob agitação contínua (350 rpm). Depois de atingida a temperatura a solução foi colocada num banho de gelo para arrefecimento rápido, durante 30 min.

A mistura foi transferida para um tubo de falcon e em seguida, sujeita a centrifugação à 6000 rpm por 30 min, a uma temperatura de 15°C (Centurion K24OR refrigerated centrifuge, West Sussex, UK). O sobrenadante foi filtrado através de um sistema de filtragem a vácuo. Os sólidos restantes no interior do tubo foram novamente centrifugados e filtrados sob as mesmas condições.

O extrato foi misturado com um igual volume de etanol: água (30:70), e colocou-se sob agitação durante 10 min à temperatura ambiente. O precipitado foi separado por centrifugação, sob as mesmas condições descritas. Em seguida, o precipitado foi disperso em 40 mL de etanol a 70% e agitado por 10 min a 250 rpm a temperatura ambiente, posteriormente o álcool foi retirado por meio de centrifugação nas condições descritas anteriormente. O extrato de pectina, como pode ser observado nas **Figuras 18 e 19** foi congelado e liofilizado. O rendimento foi determinado, dividindo-se a massa de pectina extraída pelo total de massa de casca de romã utilizada:

$$\%pectina = \frac{\text{massa de pectina}}{\text{massa de casca de romã}} \times 100$$

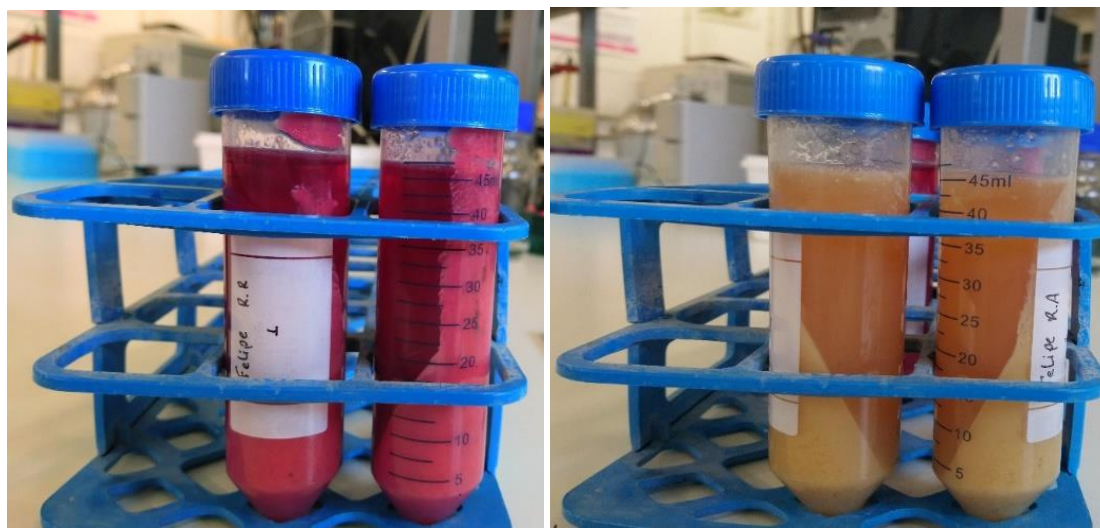


Figura 18 – Purple Queen (esquerda) e Mollar de Elche (direita) extração pectina com pH de 1,5.

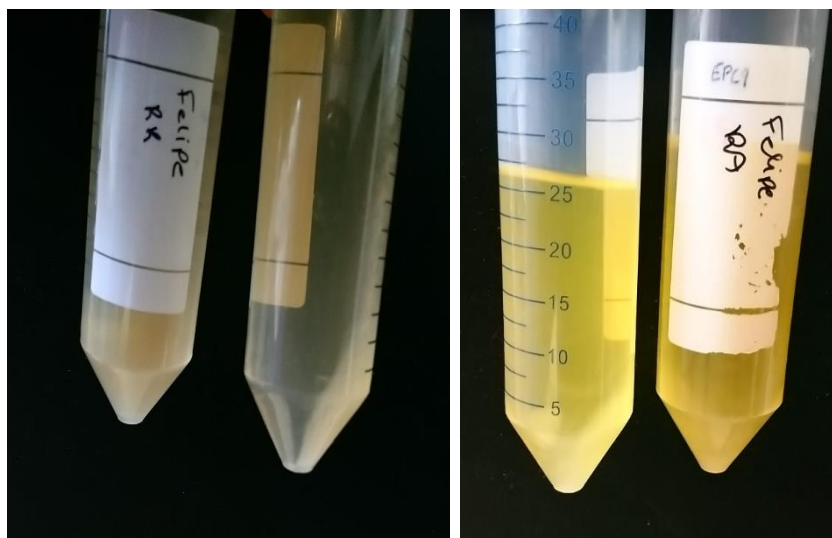


Figura 19 - Romão Purple Queen e Romão Mollar de Elche extração pectina com pH de 3.

3.7 Incorporação do extrato num produto de pastelaria

Para avaliar o potencial funcionalizante do extrato obtido a partir da casca da romã, realizou-se a adição do extrato etanólico com bioatividade mediana num produto de pastelaria tipicamente brasileiro, o casadinho.

3.7.1 Preparação das amostras

Os casadinhos são um produto de pastelaria tipicamente brasileiro que foram preparados seguindo uma receita tradicional. Para tal foi preparada uma massa misturando apenas 3 ingredientes: 250g de farinha de trigo, 100g de açúcar e 150g de manteiga. A massa foi então dividida em três grupos, um dos quais sem adição de extrato e os restantes 2 grupos com extrato obtido a partir da casca de Purple Queen. A massa foi então dividida em pequenas porções esféricas de cerca de 1,5 cm e levaram a cozinhar num forno (HE-635, Teka, Haiger, Germany) a 180 °C durante 15 minutos. Entretanto foi preparada a geleia de romã retirando o sumo da polpa de 1 romã Purple Queen (200 mL), 200 mL de água, 200 gr de açúcar, 5 mL de sumo de limão e 0,4 g de pectina deixando-se numa placa de aquecimento (VELP Scientific, Usmate, Italy) durante aproximadamente 3h até atingir o designado ponto de estrada na área da culinária e deixar arrefecer.

Foram preparados 3 grupos de amostras (**Figura 20**): a) casadinhos formulação tradicional (CT), massa sem incorporação com recheio de goiabada (comprada num comércio local); b) casadinhos de massa enriquecida com extrato de casca de romã Purple Queen e recheio de goiabada (CEC); c) casadinhos de massa enriquecida com extrato de casca de romã e recheio de geleia de sumo e pectina obtido a partir da Purple Queen (CECP).

Todos os grupos de amostras foram preparadas em triplicado de forma a avaliar 3 tempos de prateleira distintos (imediatamente após a confeção e após 7 e 14 dias de armazenamento).

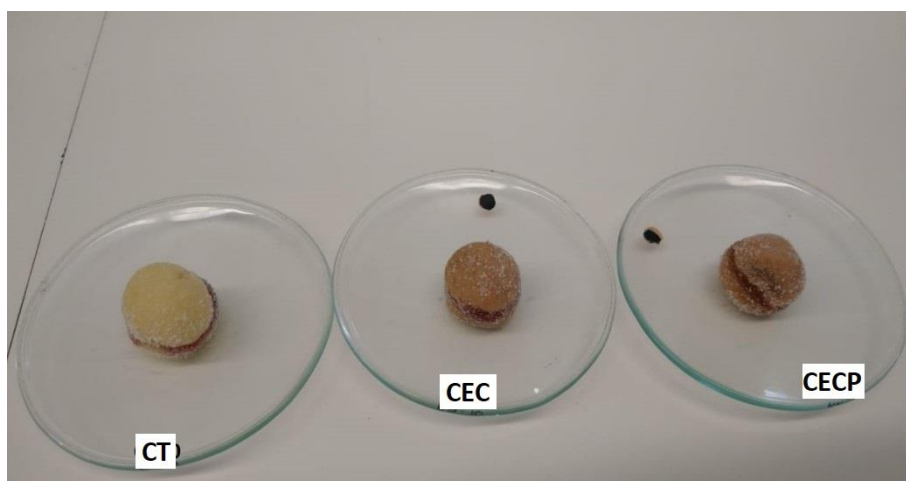


Figura 20 - Amostras dos casadinhos.

3.7.2. Avaliação das propriedades físicas dos casadinhos

3.7.2.1. Avaliação da cor ao longo do tempo

A cor das amostras foi medida em triplicado por cada grupo de amostras, em três pontos diferentes recorrendo a um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc., Tóquio, Japão). O iluminar C foi usado e uma abertura de diafragma de 8 mm foi previamente calibrado contra um ladrilho branco padrão. Os valores de espaço de cor CIE L^* (luminosidade), a^* (verde/vermelho), b^* (azul/amarelo) foram registrados utilizando o software de dados "Spectra Magic Nx" (Fernandes et al., 2012).

3.7.2.2. Avaliação da textura ao longo do tempo

A textura foi determinada em triplicado para cada amostra utilizando um equipamento TA. XT. Plus Texture Analyser (Stable Micro System) (**Figura 21**) com um disco de acrílico (40 mm) de forma a medir os seguintes parâmetros: dureza, adesividade, resiliência, coesão, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade. As amostras tinham 25 mm de diâmetro e as velocidades de subida e de descida da sonda foram 1 mm/s e 5 mm/s, respectivamente.

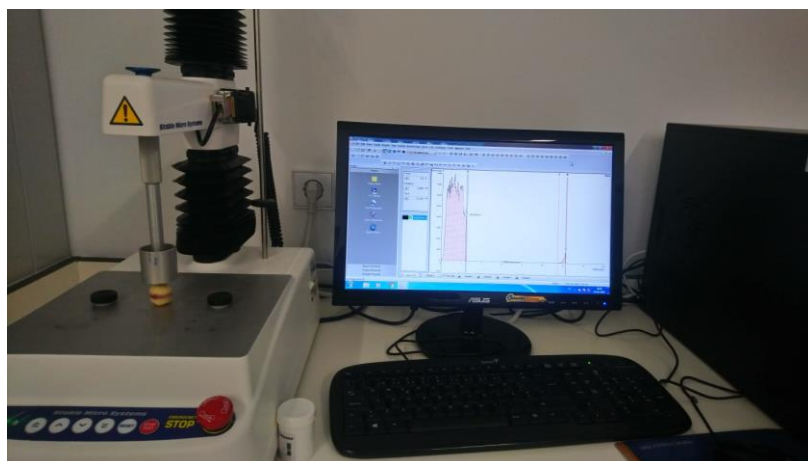


Figura 21 - Texturômetro

3.7.2.3. Avaliação das propriedades nutricionais dos casadinhos ao longo do tempo

Seguindo os métodos da AOAC (AOAC, 2016), foram determinados os teores de proteína, gordura, hidratos de carbono e cinzas. A energia total foi calculada seguindo a equação: Energia (kcal) = $4 \times (\text{g proteínas} + \text{g carboidratos}) + 9 \times (\text{g lipídios})$.

O teor de proteína total ($N \times 5,70$) foi calculado como teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl, enquanto a gordura bruta dependeu da extração de amostras secas com éter de petróleo usando um aparelho de Soxhlet. O conteúdo de cinzas foi determinado pela

incineração a 550 ± 15 ° C, e os **hidratos de carbono calculados por diferença**. (Barros et al., 2013).

Ácidos gordos: Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), após procedimento de transesterificação. Os ácidos gordos (obtidos após extração com Soxhlet, **Figura 19**) foram metilados com 5 mL de metanol: ácido sulfúrico: tolueno 2: 1: 1 (v: v: v), durante pelo menos 12 h em banho a 50 °C e 160 rpm; depois foram adicionados 3 mL de água desionizada, para obter a separação de fases; e de seguida foram adicionados 3 mL de éter dietílico por agitação em vórtex e a fase superior foi passada através de uma micro coluna de sulfato de sódio anidro, a fim de eliminar a água; a amostra foi recuperada num vial com Teflon e, antes da injeção, a amostra foi filtrada com filtro de nylon de 0,2 µm da Whatman (Barros et al., 2013). A análise foi realizada com o equipamento DANI modelo GC 1000 equipado com um injetor, um detetor de ionização de chama (FID a 260 °C) e uma coluna Macherey-Nagel (Düren, Alemanha) (50% cianopropil-metil- 50% fenilmetilpolissiloxano, 30 m x 0,32 mm id x 0,25 µm df). O fluxo de gás transportador (hidrogênio) foi de 4,0 mL / min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção de divisão (1:40) foi realizada a 250 °C. A identificação dos ácidos gordos foi realizada comparando os tempos de retenção relativos dos picos FAME das amostras com os padrões. Os resultados foram registados e processados usando o Software CSW 1.7 (DataApex 1.7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.



Figura 22- Extração de ácidos gordo por Soxhlet.

Açúcares: Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RI). O pó de amostra seca (1,0 g) foi misturado com a melezitose como padrão interno (IS, 5 mg / mL) e foi extraído com 40 mL de etanol aquoso a 80% a 80 °C por 30 min. A suspensão resultante foi centrifugada (centrífuga refrigerada Centurion K24OR, West Sussex, UK) a 15.000 g durante 10 min. O sobrenadante foi concentrado a 60°C sob pressão reduzida e desengordurado três vezes com 10 mL de éter etílico, sucessivamente. Após a concentração a 40 °C, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água para um volume final de 5 mL e filtrados através de filtros de nylon de 0,2 µm da Whatman (Barros et al., 2013). O equipamento de análise consistiu de um sistema integrado com uma bomba (Knauer, sistema Smartline 1000, Berlim, Alemanha), sistema degaseificador (Smartline manager 5000), amostrador automático (AS-2057 Jasco, Easton, MD) e um detector RI (Knauer Smartline 2300). Os dados foram analisados usando o software Clarity 2.4 (DataApex). A fase móvel foi acetonitrilo / água desionizada, 70:30 (v / v) a um caudal de 1 mL / min. Os compostos foram identificados por comparações cromatográficas com padrões standards. A quantificação foi realizada utilizando o método padrão interno e os teores de açúcar foram ainda expressos em g por 100 g de peso seco (dw).

3.7.2.4. Avaliação da atividade antioxidante das diferentes amostras de casadinhos ao longo do tempo

Todas as amostras liofilizadas foram extraídas como previamente mencionado anteriormente. Em seguida, os extratos foram dissolvidos em etanol para preparar uma concentração final de 200 mg/mL. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada recorrendo a dois ensaios referidos anteriormente.

3.8. Análise Estatística

Para cada extrato (aquoso, etanólico ou hidroalcoólico) foram analisadas três amostras independentes, cada uma das quais posteriormente analisada em triplicado. Da mesma forma, de cada formulação de “casadinho”, foram também selecionadas três amostras independentes e cada amostra foi analisada em triplicado. Os dados foram expressos como média±desvio padrão. Os testes estatísticos foram aplicados considerando um valor de $\alpha = 0,05$ (95% de confiança), utilizando o *software* IBM SPSS Statistics for Windows, versão 25.0. (IBM Corp., USA).

Foi feita uma análise de variância (ANOVA), com base no teste de Tukey (quando se verificou homoscedasticidade das distribuições) ou no teste de Tamhane’s T2 (distribuições heteroscedásticas) para conseguir classificar as diferenças estatísticas entre os diferentes parâmetros avaliados em cada um dos extratos ou dos “casadinhos”. O cumprimento dos requisitos da ANOVA, especificamente a normalidade da distribuição dos resultados e a homogeneidade das variâncias, foi verificado através dos testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respetivamente.

No caso dos casadinhos, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com soma de quadrados tipo III, utilizando o procedimento GLM (Modelo Linear Generalizado). Todas as variáveis dependentes foram analisadas utilizando uma ANOVA a 2 fatores, especificamente a formulação (F) e o tempo de armazenamento (TA). Nos casos em que se verificou uma interação significativa entre os dois fatores, os resultados foram comparados através dos gráficos das médias marginais estimadas, em todos os casos em que o efeito de cada fator individual foi estatisticamente significativo. Todos os testes estatísticos foram efetuados com um nível de significância de 5%, com o “software” SPSS (v. 25).

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização fenólica dos extratos de casca de romã

Do ponto de vista do conteúdo em compostos bioativos, a romã tem particular interesse pelo seu perfil em compostos fenólicos, já descritos como exercendo excelentes atividades fisiológicas (atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória), inclusivamente com ação preventiva de doenças (Lansky & Newman, 2007; Subash et al., 2014). Os compostos fenólicos estão essencialmente presentes na casca, um componente não edível do fruto que pode representar mais de 50% do seu peso total (Yang et al., 2018). Neste estudo, as duas cultivares (“Mollar de Elche” e “Purple Queen”) avaliadas foram selecionadas pelas suas diferentes características fenotípicas (**Figura 23 e 21**). Além das potenciais diferenças induzidas por cada cultivar, foi também verificada a influência do líquido (água, etanol ou uma mistura hidroalcoólica equimássica dos dois anteriores) utilizado na maceração.

Assim, este estudo comparou diferentes tipos de solventes na extração de compostos fenólicos da casca de duas variedades de romã: Mollar de Elche e Purple Queen. A caracterização química do perfil fenólico foi realizada por HPLC-DAD-ESI/MS e revelou a presença de catorze compostos fenólicos na Mollar de Elche e dezessete na Purple Queen.



Figura 23 – Romã Mollar de Elche. **Fonte:**

https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Granada_Mollar_de_Elche_DOP.jpg



Figura 24 – Romã Purple Queen. **Fonte:**
https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Granada_Mollar_de_Elche_DOP.jpg

A **Tabela 3** descreve os parâmetros cromatográficos e dados espectrais que foram tidos em conta na identificação dos compostos presentes nos extratos das cascas de romã. O perfil fenólico, caracterizado por HPLC-DAD-ESI/MS, dos extratos etanólicos, aquosos e hidroalcoólicos. Os compostos foram identificados tendo em atenção os dados cromatográficos e espectrais anteriormente descritos na literatura para a romã (Ambigaipalan et. al.,2017; Brighenti et al., 2017; Fischer et al., 2011; He et al., 2011; Mena et al., 2012; Qu et al., 2012; Wafa et al., 2017; Yaich et al., 2017; Nuncio-Jáuregui et. al.,2015). Os compostos identificados incluíram cinco ácidos fenólicos, sete taninos hidrolisáveis e cinco flavonoides (dois flavonóis e três antocianinas glicosiladas).

Entre os ácidos fenólicos (ou derivados), o pico 1 foi identificado como galofílglucose, apresentando um ião molecular $[M-H]^-$ de m/z 331, que libertou um fragmento MS^2 a m/z 169 ($[M-162]^-$, correspondente à perda de uma hexose referente ao ácido gálico. O pico 12 foi identificado como ácido gálico, de acordo com os espectros de massa e UV e os tempos de retenção do padrão comercial. Já os picos 7 ($[M-H]^-$ a m/z 463), 10 ($[M-H]^-$ a m/z 433) e 11 ($[M-H]^-$ a m/z 447), apresentaram espectros UV-vis e de massa característicos de derivados do ácido elágico, tendo produzido um fragmento principal MS^2 a m/z 301 (ácido elágico), após a libertação de unidades hexosilo (-162 mu, pico 7), pentosilo (-132 mu, pico 10) ou ramnosilo (-146 mu, pico 11). Estes derivados de ácidos fenólicos foram previamente descritos em extratos de romã (Ambigaipalan et. al., 2016; Brighenti et al., 2017; Yaich et al., 2017).

Os compostos identificados como elagitaninos corresponderam aos picos 2-6, 8, e 9. Os picos, 3 e 4, em particular foram identificados como isómeros I e II de punicalagina,

com base no íon pseudomolecular detetado ($[M-H]^-$ a m/z 1083) e o padrão de fragmentação anteriormente descrito por Ambigaipalan et al. (2016), Qu et al. (2012) e Mena et al. (2012). Estas moléculas foram também indicadas como sendo os elagitaninos maioritários descritos em sumos de romã, o que também se verificou no presente estudo (ver secção seguinte). O pico 2 ($[M-H]^-$ a m/z 783) apresentou fragmentos a m/z 481 e 301, permitindo a sua identificação como pedunculagina (bis-HHDP-glucose) (Mena et al., 2012). As características espectrais de massa do pico 3 ($[M-H]^-$ a m/z 633; fragmentos a m/z 463 e 301) coincidem com o galoíl-HHDP-glucose, também já descrito em romã (Fischer et al., 2011; Mena et al., 2012). De forma similar, o pico 6 foi identificado como digaloíl-digalloyl-HHDP-glucose, outro composto comum em romã (Ambigaipalan et al., 2016; Brighenti et al., 2017; Mena et al., 2012; Wafa et al., 2017). Os picos 8 e 9 apresentaram o mesmo íon molecular ($[M-H]^-$ at m/z 633), que neste caso foi atribuído à granatina B (digaloíl-HHDP-DHHDP-hexose), tendo sido identificados como dois derivados distintos deste composto (Brighenti et al., 2017; Mena et al., 2012; Wafa et al., 2017).

Em relação aos flavonoides, os picos 13 e 14, considerando sua absorvância máxima a um comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) de 348 nm e o padrão de fragmentação característico de derivados glicosilados de canferol, foram identificados (tendo também por base o seu espectro UV e tempo de retenção) como canferol-3-*O*-rutinósido e canferol-3-*O*-glucósido, respetivamente, ambos previamente descritos em romã (He et al., 2011; Mena et al., 2012).

Tendo em atenção as diferenças quantitativas entre as duas variedades estudadas, e para poder avaliar a influência do solvente de extração independentemente dessas diferenças os resultados da quantificação de compostos fenólicos foram divididos em duas tabelas, cada uma correspondente a uma variedade de romã.

No caso da romã Purple Queen, foram ainda identificadas as antocianinas cianidina-3-*O*-glucósido e pelargonidina-3-*O*-glucósido após comparação dos dados cromatográficos e espectrais com padrões comerciais. Uma terceira antocianina ($[M-H]^-$ at m/z 611) foi identificada como cianidina-3,5-*O*-diglucósido, tendo por base o seu padrão de fragmentação. As três antocianinas identificadas são também características de romã (Abid et al., 2017; Brighenti et al., 2017; Fischer et al., 2011; Mena et al., 2012).

Tendo em atenção as diferenças quantitativas entre as duas variedades estudadas, e para poder avaliar a influência do solvente de extração independentemente dessas

diferenças os resultados da quantificação de compostos fenólicos foram divididos em duas tabelas, cada uma correspondente a uma variedade de romã.

No caso da variedade Mollar de Elche (**Tabela 4**), os compostos maioritários foram os dois isómeros de punicalagina e o galoíl-HHDP-glucose, tendo-se verificado esta tendência para os três tipos de extrato. De forma genérica, os extratos obtidos com etanol apresentaram conteúdos significativamente superiores aos dos restantes tipos de extrato. A maior eficácia do etanol para a extração de compostos fenólicos da casca de romã foi também verificada no caso da variedade Purple Queen (**Tabela 5**). Da mesma forma, os compostos maioritários foram os dois isómeros de punicalagina, embora neste caso as quantidades obtidas tenham sido inferiores àquelas que se conseguiram no caso da variedade Mollar de Elche. Por outro lado, só nesta variedade se conseguiram detetar antocianinas, especificamente cianidina-3,5-*O*-diglucose, cianidina-3-*O*-glucose e pelargonidina-3-*O*-glucose. No caso particular deste sub-grupo, o extrato aquoso foi o que permitiu o maior rendimento, o que está de acordo com a maior polaridade deste tipo de compostos. O perfil em antocianinas está também de acordo com resultados anteriormente publicados em diferentes amostras de romã (Abid et al., 2017; Brighenti et al., 2017; Fischer et al., 2011; Mena et al., 2012).

Resultados e Discussão

Tabela 3. Tempo de retenção (R_t), comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$), dados espectrais de massa e tentativa de identificação dos compostos fenólicos

Pico	R_t (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Íon molecular $[M-H]^-$ (m/z)	MS^2 (m/z)	Tentativa de identificação
1	4,4	267	331	169(100), 125(33)	Galoíglucose
2	4,6	258, 368	783	481(44), 301(100)	Pedunculagina (bis-HHDP glucose)
3	6,1	256, 378	1083	781(26), 601(13), 301(100)	Isómero I de punicalagina
4	7,4	254, 378	1083	781(33), 601(21), 301(100)	Isómero II de punicalagina
5	8,9	278	633	463(31), 301(100)	Galoíl-HHDP-glucose
6	13,5	278	785	633(17), 615(5), 483(100), 419(8), 301(50)	Digaloíl-HHDP-glucose
7	15,3	253, 358	463	301(100)	Ácido elágico-hexose
8	16,6	276	951	933(100), 631(12), 613(9), 463(17), 301(48)	Isómero I de granatina B (Digaloíl-HHDP-DHHDP-hexose)
9	17,3	276	951	933(100), 631(15), 613(5), 463(12), 301(49)	Isómero II de granatina B (Digaloíl-HHDP-DHHDP-hexose)
10	20,6	256, 364	433	301(100)	Ácido elágico-pentose
11	21,0	256, 364	447	301(100)	Ácido elágico-ramnose
12	22,0	256, 364	301	284(10), 245(5), 185(11), 173(4), 157(6), 145(5)	Ácido elágico
13	23,4	346	593	285(100)	Canferol-3- <i>O</i> -rutinose
14	25,0	348	447	285(100)	Canferol-3- <i>O</i> -glucose
Antocianinas					
15	8,9	515	611	449(23), 287(100)	Cianidina-3,5- <i>O</i> -diglucose
16	16,9	514	449	287(100)	Cianidina-3- <i>O</i> -glucose
17	20,0	505	433	271(100)	Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucose

Resultados e Discussão

Tabela 4. Quantificação de compostos fenólicos (mg/100 g de peso seco) em diferentes extratos da casca de romã da variedade Mollar de Elche.

	Tipo de extrato			Homoscedasticidade ² (valor de <i>p</i>) (n = 27)	ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 27)
	Aquoso	Etanólico	Hidroalcoólico		
Galoíglucose ^A	5,9±0,1 b	8,4±0,4 a	5,7±0,3 b	0,003	<0,001
Pedunculagina (bis-HHDP glucose) ^B	3,5±0,4 c	11,8±0,4 a	7,0±0,4 b	0,896	<0,001
Isómero I de punicalagina ^B	23±2 c	61±2 a	40±2 b	0,975	<0,001
Isómero II de punicalagina ^B	18±2 c	73±3 a	28±2 b	0,403	<0,001
Galoíl-HHDP-glucose ^B	12±1 c	21±1 a	15±1 b	0,477	<0,001
Digaloíl-HHDP-glucose ^B	8±1 c	11±1 a	10±1 b	0,029	<0,001
Ácido elágico-hexose ^B	5,2±0,3 c	7,7±0,3 a	4,7±0,3 b	0,936	<0,001
Isómero I de granatina B (Digaloíl-HHDP-DHHDP-hexose) ^B	8,0±0,5 c	10,6±0,4 a	8,7±0,4 b	0,190	<0,001
Isómero II de granatina B (Digaloíl-HHDP-DHHDP-hexose) ^B	2,4±0,3 c	4,3±0,3 a	2,1±0,2 b	0,225	<0,001
Ácido elágico-pentose ^B	1,9±0,2 a	2,0±0,2 a	1,5±0,2 b	0,290	<0,001
Ácido elágico-ramnose ^B	1,3±0,1 c	2,1±0,3 a	0,9±0,2 b	0,043	<0,001
Ácido elágico ^B	4,3±0,2 c	6,2±0,5 a	3,1±0,5 b	0,143	<0,001
Canferol-3- <i>O</i> -rutinose ^C	1,3±0,1 a	1,0±0,1 b	0,8±0,1 c	0,652	<0,001
Canferol-3- <i>O</i> -glucose ^D	0,5±0,1 a	0,5±0,1 ab	0,4±0,1 b	0,029	0,013

Retas-padrão: A: ácido elágico ($y = 365,2x - 38,923$; $R^2 = 0,999$); B: ácido gálico ($y = 38,466x + 35,44$; $R^2 = 0,999$); C: canferol-3-*O*-rutinose ($y = 182,94x + 96,644$; $R^2 = 0,997$); D: canferol-3-*O*-glucose ($y = 236,33x + 70,006$; $R^2 = 0,999$). ¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de *p* superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de *p* for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas em pelo menos um dos tipos de extrato (identificadas com letras diferentes).

Resultados e Discussão

Tabela 5. Quantificação de compostos fenólicos (mg/100 g de peso seco) em diferentes extratos da casca de romã da variedade Purple Queen.

	Tipo de extrato			Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 27)	ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 27)
	Aquoso	Etanólico	Hidroalcoólico		
Galoíglucose ^A	1,0±0,1 c	2,1±0,2 a	1,3±0,1 b	<0,001	<0,001
Pedunculagina (bis-HHDP glucose) ^B	1,2±0,1 c	2,4±0,2 a	1,7±0,1 b	0,217	<0,001
Isômero I de punicalagina ^B	12±1 c	30±1 a	16±1 b	0,348	<0,001
Isômero II de punicalagina ^B	15±1 c	41±3 a	20±1 b	<0,001	<0,001
Galoíl-HHDP-glucose ^B	2,4±0,2 c	6,6±0,5 a	3,2±0,2 b	<0,001	<0,001
Digaloíl-HHDP-glucose ^B	1,1±0,1 b	1,7±0,2 a	0,9±0,1 c	0,004	<0,001
Ácido elágico-hexose ^B	1,2±0,1 c	3,2±0,2 a	1,7±0,1 b	0,188	<0,001
Isômero I de granatina B (Digaloíl-HHDP-DHHDP-hexose) ^B	2,8±0,1 c	5,4±0,2 a	3,3±0,2 b	0,403	<0,001
Isômero II de granatina B (Digaloíl-HHDP-DHHDP-hexose) ^B	1,1±0,1 b	1,6±0,1 a	0,6±0,1 c	0,337	<0,001
Ácido elágico-pentose ^B	0,6±0,1 a	0,7±0,1 a	0,8±0,1 a	<0,001	<0,001
Ácido elágico-ramnose ^B	0,7±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	0,190	0,207
Ácido elágico ^B	0,7±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	0,009	0,944
Canferol-3- <i>O</i> -rutinose ^C	0,4±0,1 ab	0,3±0,1 c	0,5±0,1 a	0,835	0,013
Canferol-3- <i>O</i> -glucose ^D	0,18±0,02 b	0,19±0,04 b	0,27±0,04 a	0,058	0,013
Antocianinas					
Cianidina-3,5- <i>O</i> -diglucósido ^E	7,9±0,4 a	4,5±0,2 c	5,7±0,3 b	0,039	<0,001
Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido ^E	7,3±0,2 a	4,0±0,1 c	5,1±0,3 b	0,097	<0,001
Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucósido ^F	4,3±0,2 a	1,8±0,1 c	2,5±0,2 b	0,062	<0,001

Retas-padrão: A: ácido elágico ($y = 365,2x - 38,923$; $R^2 = 0,999$); B: ácido gálico ($y = 38,466x + 35,44$; $R^2 = 0,999$); C: canferol-3-*O*-rutinose ($y = 182,94x + 96,644$; $R^2 = 0,997$); D: canferol-3-*O*-glucose ($y = 236,33x + 70,006$; $R^2 = 0,999$); E: cianidina-3-*O*-glucósido ($y = 134578x - 3E6$; $R^2 = 0,999$); F: pelargonidina-3-*O*-glucósido ($y = 61493x - 628875$; $R^2 = 0,996$). ¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de *p* superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de *p* for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas em pelo menos um dos tipos de extrato (identificadas com letras diferentes).

4.2. Determinação da bioatividade dos extratos de casca de romã

A bioatividade dos extratos de romã foi avaliada considerando especificamente a atividade antioxidante (método de inibição da formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico, TBARS), antibacteriana (contra um painel de 5 bactérias Gram-positivas e 3 Gram-negativas, recorrendo ao método de microdiluição), hepatotoxicidade (em células PLP2), e potencial citotóxico (em linhas celulares tumorais humanas) pelo método da sulforrodamina B.

Como poderia de alguma forma ser antecipado, tendo em consideração os teores de compostos fenólicos descritos na secção anterior, todos os extratos apresentaram uma significativa atividade antioxidante. No caso da romã Mollar de Elche, a atividade mais alta foi medida no extrato aquoso (10 µg/mL), enquanto na variedade Purple Queen o extrato com maior capacidade de inibição deste tipo de peroxidação lipídica foi o hidroalcoólico (10 µg/mL). Assim, não se verificou uma correlação direta com as quantidades de compostos fenólicos que, como descrito na secção anterior, foram maiores no extrato etanólico, indicando que outros compostos com atividade antioxidante poderão estar presentes nos extratos. Ainda assim, os valores de EC₅₀ mais baixos foram obtidos na variedade Mollar de Elche, o que está de acordo com as maiores concentrações de compostos fenólicos quantificadas nesta variedade, quando comparada com a Purple Queen.

A par da atividade antioxidante, a citotoxicidade avaliada nos extratos de casca de Mollar de Elche também foi superior àquela observada para os extratos de Purple Queen. Em ambos os casos, porém, foi verificada uma maior eficácia dos extratos etanólicos. A linha celular com maior inibição de crescimento foi a Hela (91 µg/mL para o extrato etanólico de Mollar de Elche; 153 µg/mL para o extrato etanólico de Purple Queen), enquanto que a que demonstrou ser menos afetada foi a NCI-H460 (194 µg/mL para o extrato etanólico de Mollar de Elche; 268 µg/mL para o extrato etanólico de Purple Queen), como apresentado na **Tabela 6**. Esta diferenciação da capacidade inibitória foi verificada independentemente do tipo extrato. No caso da hepatotoxicidade, os valores de GI₅₀ foram superiores em todos os casos, o que pode considerar-se como um bom resultado, apesar da

menor taxa de proliferação que caracteriza esta linha celular, quando comparada com as linhas celulares tumorais que foram avaliadas.

Resultados e Discussão

Tabela 6. Resultados da inibição de formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da citotoxicidade em diferentes extratos da casca de romã das variedades Mollar de Elche e Purple Queen.

	Tipo de extrato			Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 27)	ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 27)
	Aquoso	Etanólico	Hidroalcoólico		
<i>Mollar de Elche</i>					
Inibição da formação de TBARS (EC ₅₀ , µg/mL)	10±1 c	18±1 a	16±1 b	0,002	<0,001
PLP2 (GI ₅₀ , µg/mL)	333±9 a	276±12 b	295±34 b	<0,001	<0,001
HeLa (GI ₅₀ , µg/mL)	141±2 b	92±3 c	178±5 a	0,042	<0,001
HepG2 (GI ₅₀ , µg/mL)	196±6 b	111±4 c	228±4 a	0,153	<0,001
MCF7 (GI ₅₀ , µg/mL)	178±4 b	122±6 c	216±6 a	0,191	<0,001
NCI-H460 (GI ₅₀ , µg/mL)	211±16 b	194±3 c	259±5 a	<0,001	<0,001
<i>Purple Queen</i>					
Inibição da formação de TBARS (EC ₅₀ , µg/mL)	29±1 c	37±1 a	19±3 b	0,001	<0,001
PLP2 (GI ₅₀ , µg/mL)	354±24 a	299±12 b	357±7 b	0,012	<0,001
HeLa (GI ₅₀ , µg/mL)	223±6 b	153±6 c	321±13 a	0,010	<0,001
HepG2 (GI ₅₀ , µg/mL)	205±5 b	216±2 c	318±6 a	0,026	<0,001
MCF7 (GI ₅₀ , µg/mL)	246±13 b	228±8 c	269±6 a	0,030	<0,001
NCI-H460 (GI ₅₀ , µg/mL)	260±11 b	268±36 c	250±14 a	0,001	0,293

¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de *p* superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de *p* for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas em pelo menos um dos tipos de extrato (identificadas com letras diferentes).

Resultados e Discussão

Tabela 7. Resultados da atividade antibacteriana de diferentes extratos da casca de romã das variedades Mollar de Elche e Purple Queen.

		Tipo de extrato				
		Aquoso (CMI) ^A	Etanólico (CMI) ^A	Hidroalcoólico (CMI) ^A	Ampicilina (20 mg/mL)	Imipenem (1 mg/mL)
Bactérias Gram-negativas						
<i>Escherichia coli</i>	Mollar de Elche	2,5	1,25	2,5	CMI: <0,15	CMI: <0,0078
	Purple Queen	2,5	1,25	1,25	CMB: <0,15	CMB: <0,0078
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mollar de Elche	2,5	2,5	1,25	CMI: 10	CMI: <0,0078
	Purple Queen	5	2,5	2,5	CMB: 20	CMB: <0,0078
<i>Morganella morganii</i>	Mollar de Elche	1,25	1,25	2,5	CMI: 20	CMI: <0,0078
	Purple Queen	2,5	1,25	1,25	CMB: >20	CMB: <0,0078
<i>Proteus mirabilis</i>	Mollar de Elche	1,25	1,25	2,5	CMI: <0,15	CMI: <0,0078
	Purple Queen	2,5	1,25	1,25	CMB: <0,15	CMB: <0,0078
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mollar de Elche	10	10	10	CMI: >20	CMI: 0,5
	Purple Queen	20	10	10	CMB: >20	CMB: 1
Bactérias Gram-positivas						
<i>Enterococcus faecalis</i>	Mollar de Elche	1,25	0,625	0,625	CMI: <0,15	nt
	Purple Queen	2,5	2,5	2,5	CMB: <0,15	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Mollar de Elche	5	2,5	2,5	CMI: <0,15	CMI: <0,0078
	Purple Queen	5	5	5	CMB: <0,15	CMB: <0,0078
MRSA	Mollar de Elche	0,625	0,625	0,625	CMI: <0,15	nt
	Purple Queen	1,25	0,625	0,625	CMB: <0,15	

A: Não são apresentados os valores de concentração bactericida mínima (CMB) para os extratos porque não foi verificada esta atividade até à concentração máxima ensaiada (20 mg/mL). CMI: concentração mínima inibitória. CMB: concentração bactericida mínima. MRSA: *Staphylococcus aureus* multi-resistente.

De acordo com a **Tabela 7**, verifica-se que todas as amostras apresentaram atividade inibitória contra todos os microrganismos analisados. No entanto não revelaram capacidade bactericida até à máxima concentração testada de 20 mg/mL (razão pela qual se retiraram da tabela os valores das CMB: concentração mínima bactericida).

De forma geral, as bactérias Gram-positivas foram as mais sensíveis, tendo sido necessárias concentrações mais baixas (CMI = 0,625-5 mg/mL) dos extratos para inibir o seu crescimento. Dentro desta família de bactérias, o MRSA revelou maior sensibilidade apresentando valores de CMI de 0,625 - 1,25 mg/mL, seguida do *E. faecalis* (CMI = 0,625-2,5 mg/mL) e por fim a *L. monocytogenes* (CMI = 2,5 -5 mg/mL), valores estes inferiores aos reportados por Alexandre et al.(2018), no qual para MRSA obteve CMI de 3,91mg/mL e 15,63 mg/mL para *L. Monocytogenes*.

Relativamente às bactérias Gram-negativas, verifica-se que as bactérias *M. morgani*, *P. mirabilis* e *E. coli* foram as mais sensíveis às amostras analisadas (CMI = 1,25-2,5 mg/mL), seguidas da *K. pneumoniae* (CMI = 1,25-5 mg/mL) e finalmente a *P. aeruginosa*, que se revelou a mais resistente, apresentando CMI no intervalo de 10-20 mg/mL. Fawole et al.(2012) reportou valores inferiores para os extratos metanólicos, para *E. coli* 0,78 mg/mL e 0,39 mg/mL *K. pneumoniae*, entretanto, para os extratos aquosos os valores obtidos para ambas bactérias foram superiores à 12,50 mg/mL

Comparando as variedades de romã estudadas, a Mollar de Elche apresentou maior atividade antibacteriana (para todos os extratos), tal como comprovado pelos valores de CMI baixos em relação aos extratos de Purple Queen. O melhor extrato analisado foi o obtido com etanol a partir da Mollar de Elche (CMI de 0,625 e 1,25 mg/mL na maioria das bactérias testadas), o que está de acordo com a sua maior concentração de compostos fenólicos. Em contrapartida, o extrato aquoso da casca de Purple Queen foi o que apresentou atividade antibacteriana mais fraca (CMI = 1,25 a 20 mg/mL).

É importante realçar que as amostras testadas revelaram uma CMI mais baixa do que a ampicilina contra algumas bactérias. Para a inibição da bactéria *K. pneumoniae*, por exemplo, são necessárias 10 mg/mL de ampicilina, enquanto que os extratos testados revelaram a mesma capacidade com concentrações inferiores (1,25 a 5 mg/mL). De forma similar, foi necessária uma CMI de 20 mg/mL para a *M. morgani*, enquanto os extratos testados exerceram o mesmo efeito com concentrações de 1,25 a 2,5 mg/mL. Já para a *P. aeruginosa*, a ampicilina não teve atividade inibitória até 20 mg/mL, enquanto que as amostras inibiram esta bactéria com concentrações de 10 a 20 mg/mL. Estes resultados são de particular interesse, dada a crescente resistência destes microrganismos aos antibióticos

utilizados na prática clínica. Assim, a busca por alternativas naturais com eficácia semelhante ou melhor é uma prioridade global no combate a estas bactérias resistentes.

4.3. Caracterização das novas formulações de casadinhos

De uma forma geral, os diferentes extratos (destacando-se maioritariamente os extratos etanólicos) obtidos a partir da casca de ambas as variedades de romã representam uma fonte de compostos fenólicos que lhe permitem exhibir excelentes propriedades bioativas com potencial de aplicação a nível da indústria alimentar. No entanto, aquando do desenvolvimento de novos alimentos deve ter-se em conta que o produto final não poderá manifestar determinado tipo de bioatividade, como por exemplo antimicrobiana, pelas sobejamente conhecidas razões associadas com o aparecimento de estirpes microbianas multirresistentes, ou citotóxica, já que esta particularidade poderia causar efeitos indesejáveis a nível da normal proliferação celular no organismo (por exemplo ao longo do epitélio gastrointestinal). Por este motivo, e também pela maior capacidade corante dos extratos obtidos a partir da casca das romãs da variedade Purple Queen, os extratos etanólicos desta variedade foram utilizados na preparação de um produto tradicional da pastelaria Brasileira, os “casadinhos”. Numa tentativa de aproveitamento duplo da romã, foi também preparada uma formulação deste produto na qual se substituiu o recheio utilizado tradicionalmente, a goiabada, por uma geleia preparada a partir de sumo de romã e da pectina extraída a partir da casca.

Em resumo, foram preparadas três formulações: i) tradicional (CT), ii) casadinhos com incorporação de extrato de casca de romã na massa e recheio de goiabada (CEC) e iii) casadinhos com incorporação de extrato de casca de romã na massa e recheio de geleia de romã (CECP), cujo aspeto final pode ser visto na **Figura 25**.

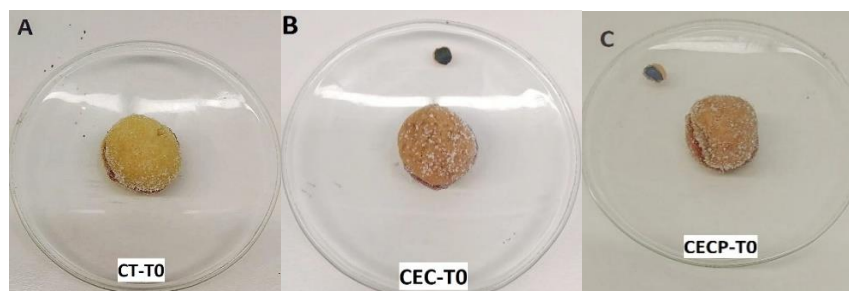


Figura 25 - Diferentes formulações de casadinhos. A: tradicional; B: CEC; C: CECP.

As diferentes formulações preparadas foram comparadas quanto à sua composição nutricional, perfil em açúcares livres e em ácidos gordos e também os parâmetros de cor: L^* , a^* e b^* . De forma a verificar a funcionalização do produto foi também avaliada a sua capacidade de inibição da peroxidação lipídica.

Convém realçar que, em qualquer dos casos, foram considerados dois fatores de variabilidade estatística, nomeadamente a formulação (F) e o tempo de armazenamento (TA). Assim, para além de avaliar a significância das alterações induzidas por cada um dos fatores individuais, é também necessário verificar se os dois fatores apresentam interação (F×TA) significativa (valor de $p < 0,005$). Esta forma de apresentação dos resultados implica que o valor apresentado para cada período de armazenamento seja obtido a partir da média dos valores das três formulações para esse período, e também, obviamente, que o resultado obtido para cada formulação seja o resultado da média dos três tempos de armazenamento para essa mesma formulação. É por esta razão que alguns dos desvios-padrão apresentam valores superiores aquilo que é considerado como idealmente aceitável.

4.3.1. Composição nutricional e perfil em açúcares dos “casadinhos”

A **Tabela 8** mostra os valores médios, em g/100 g de produto fresco, obtidos para a composição nutricional, açúcares livres e valor energético das formulações analisadas. No geral, os hidratos de carbono foram o componente mais abundante ($\approx 74\%$), seguido pela gordura ($\approx 20\%$) e a água ($\approx 3-7\%$). Em relação aos efeitos de cada fator individual, enquanto se verificaram diferenças significativas entre as formulações para todos os parâmetros, o mesmo apenas se verificou para o fator TA em relação ao teor em água, hidratos de carbono, sacarose, cinzas e energia. Como pode ser observado na tabela, esta interação foi significativa para todos os parâmetros, exceto o teor de proteína, razão pela qual a classificação decorrente dos testes de comparação múltipla foi efetuada apenas no caso deste parâmetro, e em relação ao efeito da formulação, que apresentou maiores teores nas amostras não armazenadas e nas CECP. Em relação aos restantes parâmetros, foi possível obter algumas conclusões a partir das médias marginais estimadas que são calculadas na ANOVA a dois fatores. Assim, foi possível concluir que a frutose e a glucose apresentaram valores inferiores nas amostras CT, enquanto a sacarose foi detetada em menores concentrações nas CEPC. Já as amostras CEC apresentaram menores valores de hidratos de carbono (73 g/100 g), gordura (19 g/100 g) e energia (469 kcal/100 g), sendo,

por outro lado, as que registaram maiores teores de humidade (7 g/100 g). Em relação ao efeito do armazenamento, as diferenças induzidas não foram tão evidentes, sendo apenas de assinalar o menor conteúdo em hidratos de carbono (72 g/100 g) observado nas amostras não armazenadas (0 dias).

4.3.2. Perfil em ácidos gordos dos “casadinhos”

Como nota prévia, refira-se que foram tabelados apenas os ácidos gordos com percentagens superiores a 1% para pelo menos uma das formulações ou tempos de armazenamento.

Uma vez mais, verificou-se uma interação significativa entre os dois fatores (F×TA) para quase todos os casos, à exceção da percentagem em C15:0 ($p = 0,355$), que também não demonstrou diferenças em função de cada um dos fatores individuais. No entanto, no caso dos ácidos gordos o efeito do tempo de armazenamento foi mais significativo que o da formulação (**Tabela 9**), como se pode verificar pelo número de ácidos gordos com diferenças significativas para cada um dos fatores (no caso da formulação, verificaram-se apenas para o C10:0, C14:1, C18:0, C18:3n6 e AGPI).

Apesar destas diferenças, todas as formulações apresentaram perfis similares, caracterizando-se por elevadas percentagens de ácido palmítico ($\approx 30\%$) e ácido oleico ($\approx 21\%$), os ácidos gordos maioritários. No que diz respeito aos ácidos gordos totais os maioritários são os ácidos gordos saturados (AGS) (69%), seguindo-se os ácidos gordos monoinsaturados (AGMI), presentes em percentagens de cerca de 24%, e os ácidos gordos polinsaturados (AGPI), com valores próximos dos 7%.

Similarmente, apesar das diferenças observadas, não foi possível identificar tendências inequívocas resultantes dos diferentes níveis de cada fator; foram exceção a esta regra as percentagens menores de C14:0, C15:0, C16:0 e C16:1, que foram quantificadas nas amostras armazenadas durante 14 dias.

Assim, pode concluir-se que a adição dos extratos na massa e da geleia de romã no recheio não causaram alterações significativas no perfil de ácidos gordos que caracteriza as formulações tradicionais de casadinhos.

Resultados e Discussão

Tabela 8. Composição nutricional, açúcares livres (g/100 g de peso fresco) e valor energético (kcal/100 g de peso fresco) das diferentes formulações de “casadinhos”.

		Água	Gordura	Proteínas	Hidratos de carbono	Frutose	Glucose	Sacarose	Energia	Cinzas
Formulação (F)	CT	3±1	21±1	0,7±0,1 c	75±1	4,1±0,2	4±1	39±1	494±5	0,5±0,1
	CEC	7±1	19±1	0,8±0,1 b	73±1	5,8±0,5	7±1	38±1	469±8	0,5±0,1
	CECP	4±1	21±1	0,9±0,1 a	73±1	5,8±0,5	6±1	32±3	491±4	0,5±0,1
Valor de p (n = 27) ^A		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001
Tempo de armazenamento (TA)	0 dias	6±2	21±1	0,9±0,1	72±1	5±1	6±1	35±5	478±14	0,4±0,1
	7 dias	4±2	21±1	0,8±0,1	74±1	5±1	6±1	36±4	485±12	0,6±0,1
	14 dias	3±1	21±1	0,8±0,1	74±1	5±1	5±1	38±2	490±9	0,5±0,1
Valor de p (n = 27) ^B		<0,001	0,134	0,166	<0,001	0,262	0,212	0,006	<0,001	<0,001
F×TA Valor de p (n = 81) ^A		<0,001	0,016	0,103	0,013	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

^AValores de *p* inferiores a 0,05 indicam que pelo menos uma das formulações é significativamente diferente das restantes. ^BValores de *p* inferiores a 0,05 indicam que pelo menos um dos tempos de armazenamento é significativamente diferente dos restantes. ^CValores de *p* inferiores a 0,05 indicam uma interação significativa entre os fatores, pelo que não é possível classificar as diferenças induzidas por cada um dos fatores individuais.

Tabela 9. Perfil em ácidos gordos das diferentes formulações de “casadinhos”.

		C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1n9	C18:3n6	C18:3n3	AGS	AGMI	AGPI
Formulação (F)	CT	3±1	2,0±0,4	3,7±0,4	4,4±0,3	12±1	1,0±0,1	1,0±0,1	30±1	1,4±0,1	10,9±0,3	21±1	6,1±0,5	0,9±0,1	69±2	24±2	7,2±0,5
	CEC	4±1	1,9±0,2	3,5±0,2	4,3±0,3	12±1	1,0±0,1	1,0±0,1	31±1	1,4±0,1	10,9±0,3	21±1	6,0±0,5	0,9±0,1	69±1	23±1	7,1±0,5
	CECP	3±1	1,8±0,3	3,4±0,4	4,2±0,3	12±1	0,8±0,1	1,0±0,1	31±1	1,4±0,1	11,2±0,5	21±1	6,6±0,5	1,0±0,1	69±2	24±1	7,8±0,5
Valor de p (n = 27) ^A		0,166	0,084	0,015	0,057	0,128	<0,001	0,676	0,135	0,120	0,007	0,219	<0,001	0,202	0,155	0,817	<0,001
Tempo de armazenamento (TA)	0 dias	3±1	1,8±0,2	3,4±0,3	4,4±0,2	12,2±0,5	0,9±0,1	1,0±0,1	31±1	1,4±0,1	10,9±0,3	21±1	6,3±0,3	1,0±0,1	69±2	24±2	7,3±0,3
	7 dias	3±1	1,9±0,4	3,5±0,5	4,4±0,3	12,2±0,4	1,0±0,1	1,0±0,1	31±1	1,5±0,1	11,1±0,4	21±1	5,7±0,5	0,9±0,1	69±2	24±1	6,8±0,5
	14 dias	4±1	2,1±0,1	3,6±0,2	4,1±0,2	11,4±0,5	0,9±0,1	1,0±0,1	30±1	1,4±0,1	11,0±0,4	20±1	6,7±0,5	1,0±0,1	69±1	23±1	7,9±0,5
Valor de p (n = 27) ^B		<0,001	0,001	0,048	<0,001	<0,001	0,006	0,061	<0,001	<0,001	0,361	0,012	<0,001	<0,001	0,155	0,511	<0,001
F×TA Valor de p (n = 81) ^A		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	0,355	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

^AValores de *p* inferiores a 0,05 indicam que pelo menos uma das formulações é significativamente diferente das restantes. ^BValores de *p* inferiores a 0,05 indicam que pelo menos um dos tempos de armazenamento é significativamente diferente dos restantes. ^CValores de *p* inferiores a 0,05 indicam uma interação significativa entre os fatores, pelo que não é possível classificar as diferenças induzidas por cada um dos fatores individuais.

4.3.3 Parâmetros colorimétricos e características texturais dos “casadinhos”

Para além dos aspetos nutricionais e dos componentes individuais discutidos nas secções anteriores, a análise dos parâmetros de cor (**Tabela 10**), nomeadamente, L^* , a^* e b^* , tem uma relevância acrescida, considerando que um dos primeiros objetivos era precisamente conseguir uma nova formulação do alimento em estudo, que resultasse mais apelativa para o consumidor.

As alterações observadas nas propriedades físicas, nomeadamente nos parâmetros colorimétricos e características estruturais, resultaram também da ação cooperativa de ambos os fatores, uma vez que a sua interação foi sempre significativa.

Em relação ao efeito individual de cada fator, verificou-se uma influência superior da formulação, uma vez que o tempo de armazenamento apenas causou alterações significativas na fraturabilidade ($p = 0,034$) e mastigabilidade ($p = 0,004$).

Uma vez que a interação significativa não permite classificar os resultados obtidos nas comparações múltiplas, foi uma vez mais necessário observar os gráficos das médias marginais estimadas para retirar algumas tendências nos resultados.

Em relação à luminosidade, a adição do extrato etanólico de Purple Queen causou um ligeiro abaixamento, tendo, por outro lado, e como expectável, aumentado a intensidade da tonalidade vermelha (a^*). Quanto ao parâmetro b^* , a formulação CEC apresentou valores estatisticamente inferiores, embora a magnitude da diferença seja desprezável. Deve ser referido que as pequenas variações na tonalidade da cor detetadas também podem ter sido devidas às reações de Maillard. O resultado destas reações são o aspeto dourado do alimento quando tostado ou caramelizado. Esta reação que ocorre entre os aminoácidos ou proteínas (grupos amina) e os açúcares (grupos carbonilo) quando o alimento é confeccionado, levando à produção de melanoidinas (W.-Q. Wang, Bao, & Chen, 2013).

Os “casadinhos” preparados com incorporação de extrato de romã também apresentaram menor dureza e fraturabilidade. Assim, é coerente que a mastigabilidade, ou seja, a energia necessária para mastigar o alimento, seja superior no caso da formulação tradicional, o que pode aumentar a gama de consumidores para este alimento.

4.3.4. Bioatividade das formulações de “casadinhos”

Para além da alteração na aparência e textura dos casadinhos adicionados com extrato de casca de romã, era também importante verificar se estes novos produtos mantinham a atividade antioxidante determinada nos extratos, o que constituiria uma característica vantajosa em relação aos seus eventuais efeitos sobre a saúde do consumidor.

No ensaio da inibição de formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, a formulação tradicional apresentou uma $EC_{50} = 2268 \pm 714 \mu\text{g/mL}$ (média dos três tempos), enquanto a CEC e a CECP apresentaram valores incomparavelmente mais baixos, $EC_{50} = 79 \pm 11 \mu\text{g/mL}$ e $EC_{50} = 67 \pm 21 \mu\text{g/mL}$, respetivamente. Para além desta relevante melhoria deste tipo de atividade antioxidante, foi também possível verificar que, enquanto se observou uma perda da já fraca atividade da formulação ao longo do tempo de armazenamento, nos casos da CEC e da CECP, a atividade antioxidante manteve-se inalterada ao longo dos 14 dias de armazenamento.

Tabela 10. Parâmetros colorimétricos e características texturais das diferentes formulações de “casadinhos”.

		<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	Dureza	Fraturabilidade	Mastigabilidade	Resiliência
Formulação (F)	CT	78±1	-1±1	30±1	4614±685	4571±828	172±110	0,004±0,002
	CEC	65±2	8±1	28±1	1456±252	1394±311	29±5	0,019±0,003
	CECP	64±1	8±1	30±1	2883±187	2932±152	46±13	0,023±0,002
Valor de p (n = 27) ^A		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Tempo de armazenamento (TA)	0 dias	68±7	6±5	30±2	2553±1121	2439±1043	46±16	0,02±0,01
	7 dias	70±6	5±4	29±2	2972±1288	3046±1474	77±51	0,02±0,01
	14 dias	70±7	5±4	29±2	3428±1564	3413±1511	124±138	0,01±0,01
Valor de p (n = 27) ^B		0,421	0,580	0,670	0,061	0,034	0,004	0,241
F×TA Valor de p (n = 81) ^A		0,010	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

^AValores de *p* inferiores a 0,05 indicam que pelo menos uma das formulações é significativamente diferente das restantes. ^BValores de *p* inferiores a 0,05 indicam que pelo menos um dos tempos de armazenamento é significativamente diferente dos restantes. ^CValores de *p* inferiores a 0,05 indicam uma interação significativa entre os fatores, pelo que não é possível classificar as diferenças induzidas por cada um dos fatores individuais.

5. Conclusão

Este trabalho centrou-se no aproveitamento de biorresíduos da *Punica granatum* L., extraíndo compostos com propriedades bioativas a partir da casca da romã com vista a testar o potencial como ingrediente natural funcionalizante a incorporar num produto de pastelaria.

A caracterização do perfil fenólico dos extratos obtidos a partir dos três solventes utilizados, efetuada por HPLC-DAD-ESI/MS, expressou a existência de catorze compostos fenólicos na Mollar de Elche, sendo os mais abundantes os dois isómeros da punicalagina e a galoíl-HHPD-glucose, e dezessete compostos na Purple Queen, dos quais os mais abundantes foram os dois isómeros da punicalagina, em quantidades menores às obtidas na Mollar de Elche. Por sua vez, a presença de antocianinas, nomeadamente cianidina-3,5-*O*-diglucose, cianidina-3-*O*-glucose e pelargonidina-3-*O*-glucose, foi verificada apenas na variedade Purple Queen, destacando-se o extrato aquoso como o que, devido provavelmente à polaridade do solvente, conseguiu a extração em quantidades mais elevadas.

Relativamente à atividade antioxidante, todos os extratos testados apresentaram valores de atividade antioxidante promissores sendo que relativamente à variedade Mollar de Elche, o extrato etanólico foi o que apresentou a atividade mais elevada enquanto que na variedade Purple Queen se destacou o extrato hidroalcoólico. Da mesma forma, também os extratos obtidos a partir da casca da Mollar de Elche apresentaram uma citotoxicidade superior aos da Purple Queen, e em ambos foi constatado que os extratos etanólicos possuem maior eficácia. Dentre as linhas celulares analisadas a que teve maior inibição de crescimento foi a HeLa, demonstrando que para algumas categorias de tumores os extratos podem auxiliar na desaceleração do desenvolvimento celular. Para a hepatotoxicidade, verificou-se que nenhum dos extratos analisados apresentou toxicidade até à concentração máxima testada.

No ensaio realizado para avaliar a atividade antibacteriana, verifica-se que todas as amostras demonstraram atividade inibitória contra os microrganismos testados, porém não exibiram poder bactericida na concentração máxima utilizada (20 mg/mL). As bactérias Gram-positivas foram as mais vulneráveis aos extratos, sendo necessário baixas concentrações para a inibição de seu crescimento.

As características apresentadas pelos extratos e sua bioatividade fomenta o desenvolvimento para as aplicações a nível da indústria alimentar. Devido à capacidade corante do extrato obtido a partir da casca de romã Purple Queen, aliado às bioatividades apresentadas, avançou-se com este extrato devido a sua moderada bioatividade, característica necessária para aplicação em alimentos, e sua capacidade corante. Verificou-se que a incorporação do ingrediente natural não provocou grandes variações no perfil nutricional (onde prevaleceram hidratos de carbono, gordura e água), composição em ácidos gordos (sendo os ácidos gordos saturados os maioritários tendo o ácido palmítico contribuído em grande parte para tal) ou açúcares. Relativamente aos parâmetros físicos, a formulação utilizando o extrato da romã, conseguimos alcançar o objetivo proposto de adicionar de cor à massa do biscoito, o que gerou um aumento da intensidade da tonalidade vermelha, e uma pequena diminuição da luminosidade das amostras. A adição do extrato à massa gerou também uma menor dureza e fraturabilidade, acarretando em uma mudança da mastigabilidade do alimento, possibilitando cativar uma nova gama de consumidores. A nova formulação dos casadinhos enriquecidos com extrato etanólico de casca de romã Purple Queen apresentou atividade antioxidante inalterada ao longo dos 14 dias de armazenamento, tal resultado possibilita a correlação dos alimentos com eventuais efeitos benéficos à saúde do consumidor.

O desenvolvimento de técnicas que possibilitam a utilização e exploração de produtos da cadeia lateral da indústria alimentar como fonte de ingredientes naturais é uma proposta ecologicamente necessária, frente ao avanço da produção do setor hortofrutícola. Este trabalho demonstra que com a utilização de solventes *eco friendly* e com matéria-prima que até o momento é considerada resíduo, é plausível o desenvolvimento de produtos economicamente interessantes e de interesse público.

6. Referências

- Abid, M., Cheikhrouhou, S., Renard, C. M. G. C., Bureau, S., Cuvelier, G., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2017). Characterization of pectins extracted from pomegranate peel and their gelling properties. *Food Chemistry*, *215*, 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.181>
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, *152*, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Alexandre, E. M. C., Silva, S., Santos, S. A. O., Silvestre, A. J. D., Duarte, M. F., Saraiva, J. A., & Pintado, M. (2019). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. *Food Research International*, p. 115 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.044>
- Alves, M. J., Pires, T. C. S. P., Calhella, R. C., Barros, L., Dias, M. I., Ferreira, I. C. F. R., ... Oliveira, M. B. P. P. (2017). Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Research International*, *105*, 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.014>
- Ambigaipalan, P., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2017). Identification of phenolic antioxidants and bioactives of pomegranate seeds following juice extraction using HPLC-DAD-ESI-MSn. *Food Chemistry*, *221*, 1883–1894. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.058>
- Ambigaipalan, P., De Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2016). Phenolic Compounds of Pomegranate Byproducts (Outer Skin, Mesocarp, Divider Membrane) and Their Antioxidant Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(34), 6584–6604. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02950>
- An, D., Chiu, A., Flanders, J. A., Song, W., Shou, D., Lu, Y.-C., ... Ma, M. (2018). Designing a retrievable and scalable cell encapsulation device for potential treatment of type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(2), E263–E272. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708806115>
- An, J., Zuo, G. Y., Hao, X. Y., Wang, G. C., & Li, Z. S. (2011). Antibacterial and synergy of a flavanonol rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, *18*(11), 990–993.

- <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.02.013>
- Anani, K., Adjrah, Y., Ameyapoh, Y., Karou, S. D., Agbonon, A., De Souza, C., & Gbeassor, M. (2015). Effects of hydroethanolic extracts of *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile (Balanitaceae) on some resistant pathogens bacteria isolated from wounds. *Journal of Ethnopharmacology*, *164*, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.01.051>
- Anderson, D. (1996). Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *350*(1), 103–108. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00096-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00096-8)
- Annadurai, T., Muralidharan, A. R., Joseph, T., Hsu, M. J., Thomas, P. A., & Geraldine, P. (2012). Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *68*(3), 307–318. <https://doi.org/10.1007/s13105-011-0142-y>
- AOAC. (2016, September 14). *Correct Citation of AOAC (Official Methods of Analysis of AOAC International)*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20883.89125>
- Barbulova, A., Colucci, G., & Apone, F. (2015). New Trends in Cosmetics: By-Products of Plant Origin and Their Potential Use as Cosmetic Active Ingredients. *Cosmetics*, *2*(2), 82–92. <https://doi.org/10.3390/cosmetics2020082>
- Barnes, J. (2010). Medicinal natural products. *Focus on Alternative and Complementary Therapies*, *3*(2), 78–78. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7166.1998.tb00828.x>
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chemistry*, *136*(1), 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.107>
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., & Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(6), 1076–1079. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.039>
- Barros, L., Oliveira, S., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). In vitro antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Industrial Crops and Products*, *32*(3), 572–579. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.07.012>
-
- Barrozo, M. A. S., Santos, K. G., & Cunha, F. G. (2013). Mechanical extraction of natural

- dye extract from *Bixa orellana* seeds in spouted bed. *Industrial Crops and Products*, 45, 279–282. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.052>
- BeMiller, J. N. (1986). *An Introduction to Pectins: Structure and Properties*. <https://doi.org/10.1021/bk-1986-0310.ch001>
- Bernatova, I. (2018). Biological activities of (–)-epicatechin and (–)-epicatechin-containing foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health. *Biotechnology Advances*, Vol. 36, pp. 666–681. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.009>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, Vol. 5, pp. 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bordoloi, D., K. Roy, N., Monisha, J., Padmavathi, G., & B. Kunnumakkara, A. (2015). Multi-Targeted Agents in Cancer Cell Chemosensitization: What We Learnt from Curcumin Thus Far. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 11(1), 67–97. <https://doi.org/10.2174/1574892810666151020101706>
- Braconnot, H. (1825). Recherches sur un nouvel acide universellement répandu dans tous les vegetaux [Research on on a new acid universally prevalent in all plants]. In *Annales de chimie et de physique* (Vol. 28, pp. 173–178).
- Braidwood, L., Breuer, C., & Sugimoto, K. (2014). My body is a cage: Mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytologist*, 201(2), 388–402. <https://doi.org/10.1111/nph.12473>
- Bravo, L. (2009). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Brighenti, V., Groothuis, S. F., Prencipe, F. P., Amir, R., Benvenuti, S., & Pellati, F. (2017). Metabolite fingerprinting of *Punica granatum* L. (pomegranate) polyphenols by means of high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1480, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.017>
- Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5636–5645. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408177200>
-
- Çam, M., & Hişil, Y. (2010). Pressurised⁶⁷water extraction of polyphenols from

- pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123(3), 878–885.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.011>
- Cassidy, A. (2018). Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 61, pp. 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.05.002>
- Chan, S. Y., Choo, W. S., Young, D. J., & Loh, X. J. (2016). Thixotropic supramolecular pectin-poly(ethylene glycol) methacrylate (PEGMA) hydrogels. *Polymers*, 8(11).
<https://doi.org/10.3390/polym8110404>
- Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K., & Singh, R. P. (2002). Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4791–4795.
<https://doi.org/10.1021/jf0255735>
- Cihalova, K., Chudobova, D., Michalek, P., Moulick, A., Guran, R., Kopel, P., ... Kizek, R. (2015). Staphylococcus aureus and MRSA growth and biofilm formation after treatment with antibiotics and SeNPs. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 24656–24672. <https://doi.org/10.3390/ijms161024656>
- Clifford, M. N., & Scalbert, A. (2000). Ellagitannins - Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 80, pp. 1118–1125.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1118::AID-JSFA570>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1118::AID-JSFA570>3.0.CO;2-9)
- Costa, C., Tsatsakis, A., Mamoulakis, C., Teodoro, M., Briguglio, G., Caruso, E., ... Fenga, C. (2017). Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 110, pp. 286–299.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.023>
- Croft, K. D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 435–442.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09922.x>
- Da Costa, M. P. M., De Mello Ferreira, I. L., & De Macedo Cruz, M. T. (2016). New polyelectrolyte complex from pectin/chitosan and montmorillonite clay. *Carbohydrate Polymers*, 146, 123–130.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.025>
- Da Pozzo, E., Costa, B., Cavallini, C., Testai, L., Martelli, A., Calderone, V., & Martini, C. (2017). The Citrus Flavanone Naringenin Protects Myocardial Cells against Age-Associated Damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2017/9536148>

- De Assis, S. A., Lima, D. C., & De Faria Oliveira, O. M. M. (2001). Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. *Food Chemistry*, 74(2), 133–137. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00104-2)
- de Mello, M. V. P., Abraham-Vieira, B. de A., Domingos, T. F. S., de Jesus, J. B., de Sousa, A. C. C., Rodrigues, C. R., & Souza, A. M. T. de. (2018). A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 150, pp. 920–929. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.047>
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Diaz, J. V., Anthon, G. E., & Barrett, D. M. (2007). Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: Effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5131–5136. <https://doi.org/10.1021/jf0701483>
- Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., & Kulma, A. (2016). The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17020160>
- Erkan, M., & Kader, A. A. (2011). Pomegranate (*Punica granatum* L.). In *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (Vol. 4). <https://doi.org/10.1533/9780857092618.287>
- Fang, Y., Tian, W., Pei, F., Li, P., Shao, X. L., Fan, Y., & Hu, Q. (2017). Simultaneous determination of pesticide residues and antioxidants in blended oil using a liquid-liquid extraction combined with dispersive solid phase extraction method. *Food Chemistry*, 229, 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.094>
- Fawole, O. A., Makunga, N. P., & Opara, U. L. (2012). Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 2–11. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-200>
- Fernandes, Â., Antonio, A. L., Barreira, J. C. M., Oliveira, M. B. P. P., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Effects of gamma irradiation on physical parameters of *Lactarius deliciosus* wild edible mushrooms. *Postharvest Biology and Technology*, 74, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.06.019>

- Ferraro, G. E., Martino, V., & Bandoni, A. L. (2000). *Fitocosmética: fitoingredientes y otros productos naturales : fitoingredientes y otros productos naturales* (EUDEBA, Ed.). Retrieved from <http://site.ebrary.com/lib/utnortesp/detail.action?docID=10623847>
- Fialova, S., Rendekova, K., Mucaji, P., & Slobodnikova, L. (2017). Plant Natural Agents: Polyphenols, Alkaloids and Essential Oils as Perspective Solution of Microbial Resistance. *Current Organic Chemistry*, 21(18). <https://doi.org/10.2174/1385272821666170127161321>
- Filip, S., Vidović, S., Vladić, J., Pavlić, B., Adamović, D., & Zeković, Z. (2016). Chemical composition and antioxidant properties of *Ocimum basilicum* L. extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction: Drug exhausting method. *Journal of Supercritical Fluids*, 109, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.11.006>
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), 247–254. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00002-4)
- Fischer, U. A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS n. *Food Chemistry*, 127(2), 807–821. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.156>
- Fissore, E. N., Rojas, A. M., & Gerschenson, L. N. (2012). Rheological performance of pectin-enriched products isolated from red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) through alkaline and enzymatic treatments. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.004>
- Gilbert-López, B., Plaza, M., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2017). Subcritical Water Extraction and Neoformation of Antioxidants. In *Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development* (pp. 109–130). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00004-8>
- Gómez-Caravaca, A. M., Verardo, V., Toselli, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Caboni, M. F. (2013). Determination of the major phenolic compounds in pomegranate juices by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5328–5337. <https://doi.org/10.1021/jf400684n>
- Gonçalves, R., Mateus, N., & de Freitas, V. (2011). Inhibition of α -amylase activity by condensed tannins. *Food Chemistry*, 125(2), 665–672. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.061>
- González-Montelongo, R., Lobo, M. G., & González, M. (2010). The effect of extraction

- temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Separation and Purification Technology*, 71(3), 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.12.022>
- Gullón, B., Garrote, G., Alonso, J. L., & Parajó, J. C. (2007). Production of L-lactic acid and oligomeric compounds from apple pomace by simultaneous saccharification and fermentation: A response surface methodology assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5580–5587. <https://doi.org/10.1021/jf070442v>
- Gunness, P., & Gidley, M. J. (2010). Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food and Function*, Vol. 1, pp. 149–155. <https://doi.org/10.1039/c0fo00080a>
- Günter, E. A., & Popeyko, O. V. (2016). Calcium pectinate gel beads obtained from callus cultures pectins as promising systems for colon-targeted drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 147, 490–499. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.026>
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257–265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Lörliger, J., & Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 33, pp. 601–617. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00024-V](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00024-V)
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 47, pp. 2023–2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)
- Haslam, E. (2007). Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, Vol. 68, pp. 2713–2721. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.009>
- He, L., Xu, H., Liu, X., He, W., Yuan, F., Hou, Z., & Gao, Y. (2011). Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant capacities by HPLC–ABTS+ assay. *Food Research International*, 44(5), 1161–1167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.023>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional*

- Biochemistry*, Vol. 13, pp. 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Hernández, F., Melgarejo, P., Tomás-Barberán, F. A., & Artés, F. (1999). Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *European Food Research and Technology*, 210(1), 39–42. <https://doi.org/10.1007/s002170050529>
- Hitsman, B., Papandonatos, G. D., McChargue, D. E., Demott, A., Herrera, M. J., Spring, B., ... Niaura, R. (2013). Past major depression and smoking cessation outcome: A systematic review and meta-analysis update. *Addiction*, Vol. 108, pp. 294–306. <https://doi.org/10.1111/add.12009>
- Hollman, P. C. H. (2001). Evidence for health benefits of plant phenols: Local or systemic effects? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 842–852. <https://doi.org/10.1002/jsfa.900>
- Huang, Y.-L., & Shi, S.-H. (2002). Phylogenetics of Lythraceae sensu lato : A Preliminary Analysis Based on Chloroplast rbc L Gene, psa A - ycf 3 Spacer, and Nuclear rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences. *International Journal of Plant Sciences*, 163(2), 215–225. <https://doi.org/10.1086/338392>
- Jaakola, L. (2007). Flavonoid biosynthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), S244. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.565>
- Jackson, R. S. (2000). Chemical Constituents of Grapes and Wine. In *Wine Science* (pp. 232–280). <https://doi.org/10.1016/b978-012379062-0/50007-x>
- Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P., & Brulé, G. (2016). Handbook of Food Science and Technology 3: Food Biochemistry and Technology. In *Handbook of Food Science and Technology 3: Food Biochemistry and Technology* (Vol. 3). <https://doi.org/10.1002/9781119296225>
- Jiang, N., Doseff, A., & Grotewold, E. (2016). Flavones: From Biosynthesis to Health Benefits. *Plants*, 5(2), 27. <https://doi.org/10.3390/plants5020027>
- Jurinjak Tušek, A., Benković, M., Belščak Cvitanović, A., Valinger, D., Jurina, T., & Gajdoš Kljusurić, J. (2016). Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols, antioxidants and extraction yield from Asteraceae plants. *Industrial Crops and Products*, 91, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.015>
- Kandola, K., Bowman, A., & Birch-Machin, M. A. (2015). Oxidative stress - A key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. *International*

- Journal of Cosmetic Science*, Vol. 37, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1111/ics.12287>
- Kar, F., & Arslan, N. (1999). Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity-molecular weight relationship. *Carbohydrate Polymers*, 40(4), 277–284. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00062-4)
- Karimi-Sales, E., Mohaddes, G., & Alipour, M. R. (2018). Chalcones as putative hepatoprotective agents: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Pharmacological Research*, Vol. 129, pp. 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.11.022>
- Karimi, M., Sadeghi, R., & Kokini, J. (2017). Pomegranate as a promising opportunity in medicine and nanotechnology. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 69, pp. 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.019>
- Kaushik, P., Andújar, I., Vilanova, S., Plazas, M., Gramazio, P., Herraiz, F. J., ... Prohens, J. (2015). Breeding vegetables with increased content in bioactive phenolic acids. *Molecules*, Vol. 20, pp. 18464–18481. <https://doi.org/10.3390/molecules201018464>
- Kazemi, M., Karim, R., Mirhosseini, H., & Abdul Hamid, A. (2016). Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids. *Food Chemistry*, 206, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.017>
- Kefeli, V. I., Kalevitch, M. V., & Borsari, B. (2011). Phenolic Cycle in Plants and Environment. In *Mechanisms of Landscape Rehabilitation and Sustainability* (Vol. 2, pp. 75–78). <https://doi.org/10.2174/978160805168711101010075>
- Keijbets, M. J. H., & Pilnik, W. (1974). β -Elimination of pectin in the presence of anions and cations. *Carbohydrate Research*, 33(2), 359–362. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)82815-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)82815-3)
- Ko, J. H., Sethi, G., Um, J. Y., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar, A. P., ... Ahn, K. S. (2017). The role of resveratrol in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 18, pp. 1–36. <https://doi.org/10.3390/ijms18122589>
- Koubala, B. B., Christiaens, S., Kansci, G., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2014). Isolation and structural characterisation of papaya peel pectin. *Food Research International*, 55, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.009>
- Kozłowska, A., & Szostak-Wegierek, D. (2014). Flavonoids--food sources and health benefits. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 65(2), 79–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/252732572>

- Lancaster, M. (1989). Summary for Policymakers. In *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (Vol. 53, pp. 1–30). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Lansky, E. P., & Newman, R. A. (2007). Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 109, pp. 177–206. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.006>
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.033>
- Liang, R. H., Chen, J., Liu, W., Liu, C. M., Yu, W., Yuan, M., & Zhou, X. Q. (2012). Extraction, characterization and spontaneous gel-forming property of pectin from creeping fig (*Ficus pumila* Linn.) seeds. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.013>
- Lin, C. S. K., Koutinas, A. A., Stamatelatou, K., Mubofu, E. B., Matharu, A. S., Kopsahelis, N., ... Luque, R. (2014). Current and future trends in food waste valorization for the production of chemicals, materials and fuels: A global perspective. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(5), 686–715. <https://doi.org/10.1002/bbb.1506>
- Liu, R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.010>
- Liu, Y., Shi, J., & Langrish, T. A. G. (2006). Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chemical Engineering Journal*, 120(3), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2006.02.015>
- Lu, T., Gaspar, F., Marriott, R., Mellor, S., Watkinson, C., Al-Duri, B., ... Santos, R. (2007). Extraction of borage seed oil by compressed CO₂: Effect of extraction parameters and modelling. *Journal of Supercritical Fluids*, Vol. 41, pp. 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.10.002>
- Luo, H., Jiang, B. H., King, S. M., & Chen, Y. C. (2008). Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. *Nutrition and Cancer*, 60(6), 800–809. <https://doi.org/10.1080/01635580802100851>
- Lupi, F. R., Gabriele, D., Seta, L., Baldino, N., de Cindio, B., & Marino, R. (2015). Rheological investigation of pectin-based emulsion gels for pharmaceutical and cosmetic uses. *Rheologica Acta*, 54(1), 41–52. <https://doi.org/10.1007/s00397-014-0809-8>
-
- Mahapatra, D. K., & Bharti, S. K. (2016).⁷⁴Therapeutic potential of chalcones as

- cardiovascular agents. *Life Sciences*, Vol. 148, pp. 154–172.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.048>
- Marras-Marquez, T., Peña, J., & Veiga-Ochoa, M. D. (2015). Robust and versatile pectin-based drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 479(2), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.045>
- Marx, R. E., & Garg, A. K. (2002). A novel aid to elevation of the sinus membrane for the sinus lift procedure. *Implant Dentistry*, 11(3), 268–271.
<https://doi.org/10.1097/00008505-200207000-00012>
- Mattila, P., & Hellström, J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 152–160.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.05.007>
- May, C. D. (1990). Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 12(1), 79–99. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(90\)90105-2](https://doi.org/10.1016/0144-8617(90)90105-2)
- McCann, M. C., & Roberts, K. (1996). Plant cell wall architecture: the role of pectins. *Progress in Biotechnology*, 14(C), 91–107. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80249-8](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80249-8)
- Mena, P., Calani, L., Dall’Asta, C., Galaverna, G., García-Viguera, C., Bruni, R., ... Del Rio, D. (2012). Rapid and comprehensive evaluation of (Poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by UHPLC-MSn. *Molecules*, 17(12), 14821–14840. <https://doi.org/10.3390/molecules171214821>
- Merheb, R., Abdel-Massih, R. M., & Karam, M. C. (2019). Immunomodulatory effect of natural and modified Citrus pectin on cytokine levels in the spleen of BALB/c mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.189>
- Miadoková, E. (2009). Isoflavonoids - an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(4), 211–218.
<https://doi.org/10.2478/v10102-009-0021-3>
- Miceli-Garcia, L. G. (2014). Pectin from apple pomace - extraction, characterization, and utilization in encapsulating alpha-tocopherol acetate (University of Nebraska). Retrieved from <http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1040&context=foodscidiss>
- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, Vol. 19, pp. 16240–16265.

- <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 11, pp. 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
- Munarin, F., Tanzi, M. C., & Petrini, P. (2012). Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 51, pp. 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.07.002>
- Mungure, T. E., Roohinejad, S., Bekhit, A. E. D., Greiner, R., & Mallikarjunan, K. (2018). Potential application of pectin for the stabilization of nanoemulsions. *Current Opinion in Food Science*, Vol. 19, pp. 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.011>
- Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Adnan, A., & Rizvi, S. S. H. (2015). Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. *Journal of Supercritical Fluids*, 104, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.05.020>
- Nastić, N., Švarc-Gajić, J., Delerue-Matos, C., Morais, S., Barroso, M. F., & Moreira, M. M. (2018). Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (*Teucrium montanum* L.). *Journal of Supercritical Fluids*, 138, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.04.019>
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., & Packer, L. (2002). Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: Delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 166–171. <https://doi.org/10.1021/jf0108765>
- Nuncio-Jáuregui, N., Nowicka, P., Hernández, S. M.-P. F., & Wojdyło, Á. A. C.-B. A. (2015). Identification and quantification of major derivatives of ellagic acid and antioxidant properties of thinning and ripe Spanish pomegranates. *J. Funct.*, 12, 354–364.
- Oliveira, T. Í. S., Rosa, M. F., Cavalcante, F. L., Pereira, P. H. F., Moates, G. K., Wellner, N., ... Azeredo, H. M. C. (2016). Optimization of pectin extraction from banana peels with citric acid by using response surface methodology. *Food Chemistry*, 198, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.080>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, 1–15. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2016). Extraction assisted by pulsed electric energy as a potential tool for green and sustainable recovery of nutritionally valuable compounds from mango peels. *Food Chemistry*, 192, 842–848. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.096>

- Parr, A. J., & Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 80, pp. 985–1012. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<985::AID-JSFA572>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<985::AID-JSFA572>3.0.CO;2-7)
- Paula Senent García. (2016). *Efecto del tratamiento pre-cosecha con Acido Acetil Salicílico sobre el desarrollo y maduración de la granada*. 104. Retrieved from http://dspace.umh.es/bitstream/11000/3253/1/TFG_Senent_García%2C_Paula.pdf
- Pavlič, B., Bera, O., Teslić, N., Vidović, S., Parpinello, G., & Zeković, Z. (2018). Chemical profile and antioxidant activity of sage herbal dust extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Industrial Crops and Products*, 120, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.044>
- Pellegrini, N., Colombi, B., Salvatore, S., Brenna, O. V., Galaverna, G., Del Rio, D., ... Brighenti, F. (2007). Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: Efficiency of extraction of a sequence of solvents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(1), 103–111. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2682>
- Pereira, P. H. F., Oliveira, T. Í. S., Rosa, M. F., Cavalcante, F. L., Moates, G. K., Wellner, N., ... Azeredo, H. M. C. (2016). Pectin extraction from pomegranate peels with citric acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.074>
- Pinho, E., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Carvalho, A. M., Soares, G., & Henriques, M. (2014). Antibacterial Potential of Northeastern Portugal Wild Plant Extracts and Respective Phenolic Compounds. *BioMed Research International*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/814590>
- Plumb, G. W., de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., & Williamson, G. (2002). Antioxidant properties of galocatechin and prodelfphinidins from pomegranate peel. *Redox Report*, 7(1), 41–46. <https://doi.org/10.1179/135100002125000172>
- Psotová, J., Lasovský, J., & Vicar, J. (2003). Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 147(2), 147–153. <https://doi.org/10.5507/bp.2003.020>
- Qu, W., Breksa, A. P., Pan, Z., & Ma, H. (2012). Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Food Chemistry*, 132(3), 1585–

1591. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.106>
- Raheja, S., Girdhar, A., Lather, V., & Pandita, D. (2018). Biochanin A: A phytoestrogen with therapeutic potential. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 79, pp. 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.001>
- Randhir, R., Lin, Y. T., & Shetty, K. (2004). Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*, 39(5), 637–646. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00197-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00197-3)
- Reza, M., Ardekani, S., Hajimahmoodi, M., Reza Oveisi, M., Sadeghi, N., Jannat, B., ... Moridi, T. (2011). Comparative Antioxidant Activity and Total Flavonoid Content of Persian Pomegranate (*Punica granatum L.*) Cultivars. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3), 519–524.
- Rogovskii, V. S., Matiushin, A. I., Shimanovskii, N. L., Semeikin, A. V, Kukhareva, T. S., Koroteev, A. M., ... Nifant'ev, E. E. (2010). [Antiproliferative and antioxidant activity of new dihydroquercetin derivatives]. *Ekspierimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiya*, 73(9), 39–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21086652>
- Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A. M., & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research*, Vol. 53, pp. 310–329. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900039>
- Shirmohammadli, Y., Efhamisisi, D., & Pizzi, A. (2018). Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. *Industrial Crops and Products*, 126, 316–332. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.034>
- Sila, D. N., Van Buggenhout, S., Duvetter, T., Fraeye, I., De Roeck, A., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2009). Pectins in processed fruits and vegetables: Part II - Structure-function relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 8, pp. 86–104. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00071.x>
- Silvester, A. J., Aseer, K. R., & Yun, J. W. (2019, February). Dietary polyphenols and their roles in fat browning. *Journal of Nutritional Biochemistry*, Vol. 64, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.028>
- Singh, S. K., Singh, A., Nripendra, •, Singh, V., & Ramajayam, • D. (2010). Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology Pomegranate Tissue Culture and Biotechnology. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 56–76.

- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 16, pp. 24673–24706. <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
- Sriamornsak, P. (2003). Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. *Silpakorn University International Journal*, 3(1–2), 206–228. <https://doi.org/10.5458/jag.54.211>
- Sticklen, M. B. (2008, June 1). Plant genetic engineering for biofuel production: Towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 9, pp. 433–443. <https://doi.org/10.1038/nrg2336>
- Subash, S., Essa, M. M., Al-Asmi, A., Al-Adawi, S., Vaishnav, R., Braidy, N., ... Guillemin, G. J. (2014). Pomegranate from Oman Alleviates the Brain Oxidative Damage in Transgenic Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4(4), 232–238. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.139107>
- Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7449–7454. <https://doi.org/10.1021/jf0207530>
- Takahashi, A., & Ohnishi, T. (2005). The Significance of the Study about the Biological Effects of Solar Ultraviolet Radiation using the Exposed Facility on the International Space Station. *Biological Sciences in Space*, 18(4), 255–260. <https://doi.org/10.2187/bss.18.255>
- Takamine, K., Abe, J., Shimono, K., Sameshima, Y., Morimura, S., & Kida, K. (2007). Physicochemical and Gelling Characterizations of Pectin Extracted from Sweet Potato Pulp. *Journal of Applied Glycoscience*, 54(4), 211–216. <https://doi.org/10.5458/jag.54.211>
- Tehranifar, A., Selahvarzi, Y., Kharrazi, M., & Bakhsh, V. J. (2011). High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1523–1527. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.05.007>
- Toop, T. A., Ward, S., Oldfield, T., Hull, M., Kirby, M. E., & Theodorou, M. K. (2017). AgroCycle - Developing a circular economy in agriculture. *Energy Procedia*, 123, 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.07.269>
- Turgut, S. S., Soyer, A., & Işıkkı, F. (2016). ⁷⁹Effect of pomegranate peel extract on lipid

- and protein oxidation in beef meatballs during refrigerated storage. *Meat Science*, *116*, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.02.011>
- Turrini, E., Ferruzzi, L., & Fimognari, C. (2015). Potential Effects of Pomegranate Polyphenols in Cancer Prevention and Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2015*, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2015/938475>
- Vo Dinh, T., Saravana, P. S., Woo, H. C., & Chun, B. S. (2018). Ionic liquid-assisted subcritical water enhances the extraction of phenolics from brown seaweed and its antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, *196*, 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.06.009>
- Wafa, B. A., Makni, M., Ammar, S., Khannous, L., Hassana, A. Ben, Bouaziz, M., ... Gdoura, R. (2017). Antimicrobial effect of the Tunisian Nana variety *Punica granatum* L. extracts against *Salmonella enterica* (serovars Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.007>
- Wagoner, T. B., & Foegeding, E. A. (2017). Whey protein–pectin soluble complexes for beverage applications. *Food Hydrocolloids*, *63*, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.027>
- Wang, W.-Q., Bao, Y.-H., & Chen, Y. (2013). Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Mail lard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system. In *Food chemistry* (Vol. 139). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.072>
- Wang, Y., Luan, G., Zhou, W., Meng, J., Wang, H., Hu, N., & Suo, Y. (2018). Subcritical water extraction, UPLC-Triple-TOF/MS analysis and antioxidant activity of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. *Food Chemistry*, *249*, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.078>
- Willats, W. G. T., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*, *17*(3), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.008>
- Wu, T., He, M., Zang, X., Zhou, Y., Qiu, T., Pan, S., & Xu, X. (2013). A structure-activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1828*(11), 2751–2756. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.029>
- Xi, J., He, L., & Yan, L. gong. (2017a). Continuous extraction of phenolic compounds from

- pomegranate peel using high voltage electrical discharge. *Food Chemistry*, 230, 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.072>
- Xi, J., He, L., & Yan, L. gong. (2017b). Continuous extraction of phenolic compounds from pomegranate peel using high voltage electrical discharge. *Food Chemistry*, 230, 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.072>
- Xu, L., Yu, J. qi, Wang, X. ye, Xu, N., & Liu, J. lin. (2018). Microwave extraction optimization using the response surface methodology of Fructus Meliae Toosendan polysaccharides and its antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1501–1510. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.172>
- Yaich, H., Cheikhrouhou, S., Ayadi, M. A., Khemakhem, I., Attia, H., Abid, M., & Bouaziz, M. (2017). Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC–MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. *Journal of Food Science and Technology*, 54(9), 2890–2901. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2727-0>
- Yang, X., Nisar, T., Hou, Y., Gou, X., Sun, L., & Guo, Y. (2018). Pomegranate peel pectin can be used as an effective emulsifier. *Food Hydrocolloids*, 85, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.042>
- Yao, L., Jiang, Y., Shi, J., Tomás-Barberán, F., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(3), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s11130-004-0049-7>
- Yuliarti, O., Chong, S. Y., & Goh, K. K. T. (2017). Physicochemical properties of pectin from green jelly leaf (*Cyclea barbata* Miers). *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1146–1154. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.147>
- Zhang, L., Yang, Z., Granieri, L., Pasculescu, A., Datti, A., Asa, S. L., ... Ezzat, S. (2016). High-throughput drug library screening identifies colchicine as a thyroid cancer inhibitor. *Oncotarget*, 7(15). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7890>
- Zhang, S., Hu, H., Wang, L., Liu, F., & Pan, S. (2018). Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin. *Food Chemistry*, 244, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.071>
- Zhao, X., Yuan, Z., Fang, Y., Yin, Y., & Feng, L. (2013). Characterization and evaluation of major anthocyanins in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel of different cultivars and their development phases. *European Food Research and Technology*, 236(1), 109–117. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1869-6>
- Zhong, J. J. (2011). Plant Secondary Metabolites. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Vol. 3, pp. 299–308). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-8>

9.00190-2

- Žugčić, T., Abdelkebir, R., Alcantara, C., Collado, M. C., García-Pérez, J. V., Meléndez-Martínez, A. J., ... Barba, F. J. (2019, January). From extraction of valuable compounds to health promoting benefits of olive leaves through bioaccessibility, bioavailability and impact on gut microbiota. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 83, pp. 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.005>
- Zuin, V. G., & Ramin, L. Z. (2018, February). Green and Sustainable Separation of Natural Products from Agro-Industrial Waste: Challenges, Potentialities, and Perspectives on Emerging Approaches. *Topics in Current Chemistry*, Vol. 376, p. 3. <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0182-z>
- Zuk, M., Dorotkiewicz-Jach, A., Drulis-Kawa, Z., Arendt, M., Kulma, A., & Szopa, J. (2014). Bactericidal activities of GM flax seedcake extract on pathogenic bacteria clinical strains. *BMC Biotechnology*, 14(1), 2–15. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-70>