

MAYARA CRISTIANA STANGER

**COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DE MAÇÃS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DOS FRUTOS
E APÓS O ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA
CONTROLADA DINÂMICA E ESTÁTICA**

Tese apresentada ao Centro de Ciências
Agroveterinárias da Universidade do
Estado de Santa Catarina, como requisito
parcial para obtenção do título de
Doutora em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano André
Steffens

**LAGES-SC
2016**

Stanger, Mayara Cristiana
Compostos fenólicos e atividade antioxidante de
maçãs durante o desenvolvimento dos frutos e após
o armazenamento em atmosfera controlada dinâmica e
estática / Mayara Cristiana Stanger. - Lages,
2016.

107 p.: il.; 21 cm

Orientador: Cristiano André Steffens

Bibliografia: p.89

Tese (doutorado) - Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal,
Lages, 2016.

1. *Malus domestica*. 2. Catequina. 3. Quercetina
3-galactosídeo. 4. Epicatequina. 5. Procianidina.
6. Ácido clorogênico. 7. Fluorescência de
clorofilas. 8. Quociente respiratório. I.
Stanger, Mayara Cristiana. II. Steffens, Cristiano
André. III. Universidade do Estado de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção
Vegetal. IV. Compostos fenólicos e atividade
antioxidante de maçãs durante o desenvolvimento
dos frutos e após o armazenamento em atmosfera
controlada dinâmica e estática.

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno.

MAYARA CRISTIANA STANGER

**COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DE MAÇÃS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DOS FRUTOS
E APÓS O ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA
CONTROLADA DINÂMICA E ESTÁTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Banca Examinadora:

Orientador:

Prof. Dr. Cristiano André Steffens
UDESC/Lages – SC

Membros da banca:

Dra. Aquidauana Miqueloto
UNITINS/ Palmas – TO

Dra. Ana Paula Schunemann
UDESC/Lages – SC

Dra. Cláudia Kaehler Sautter
UFSM/ Santa Maria – RS

Dr. Marcelo Alves Moreira
UDESC/Lages – SC

Lages, 27 de julho de 2016

À minha mãe, *Nedir Micuanski Stanger*, com todo meu amor e minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao meu orientador, professor e amigo, Dr. Cristiano André Steffens, pela oportunidade, confiança, dedicação, ensinamentos, sugestões, críticas, ética e, acima de tudo, pela paciência em ouvir e ensinar.

Ao professor Cassandro Vidal Talamini do Amarante, pelos ensinamentos, pela disposição e contribuição em todos os trabalhos, sempre com muita dedicação e sabedoria.

Ao professor Auri Brackmann e toda a equipe da UFSM, pela parceria nos trabalhos, comprometimento e colaboração.

Ao professor Marcelo Alves Moreira, por todos os ensinamentos, dedicação e paciência.

À minha amiga Cristina Soethe, por todo auxílio na realização dos trabalhos, pelos conhecimentos compartilhados, pelo tempo dispensado e por todas as gargalhadas.

À minha amiga e irmã de coração, Fernanda Espíndola Assumpção Bastos, pela paciência em ouvir, por compartilhar as alegrias, angustias e temores. Com suas palavras de conforto, incentivo e apoio, fez com que esse processo fosse mais leve e agradável.

À minha família, especialmente a minha mãe, por ser essa pessoa tão maravilhosa e batalhadora. À minha irmã, Monalisa, pelo incentivo e apoio. Mesmo distantes, vocês compartilham as alegrias e ajudam superar as dificuldades, sempre com palavras de carinho e conforto.

Aos bolsistas, voluntários e colegas do Laboratório de Fisiologia e Tecnologia em Pós-colheita, pelo auxílio na realização dos experimentos.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado em Produção Vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e apoio financeiro ao projeto.

Às empresas Schio e Yakult pelo fornecimento dos frutos para os experimentos.

A todos os Professores da Pós-Graduação do CAV, pelas inúmeras oportunidades de aprendizado e pela qualidade do ensino.

RESUMO

STANGER, Mayara Cristiana. **Compostos fenólicos e atividade antioxidante de maçãs durante o desenvolvimento dos frutos e após o armazenamento em atmosfera controlada dinâmica e estática**. 2016. 107 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal – Área: Biologia e Tecnologia Pós-Colheita) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2016.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar as mudanças nos conteúdos de compostos fenólicos totais (CFT) e individuais (CFI) e na atividade antioxidante total (AAT), na casca e polpa, e de antocianinas totais (ANT) na casca, durante o desenvolvimento dos frutos de macieiras ‘Brookfield[®]’ e ‘Mishima’, e avaliar o efeito do armazenamento em atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório (ACD-QR) e pela fluorescência de clorofilas (ACD-FC) e em condições de atmosfera controlada estática (AC) sobre o conteúdo de CFI e CFT e a AAT, nas porções da casca e polpa de maçãs ‘Galaxy’, bem como sobre a qualidade dos frutos após o armazenamento e mais 7 dias de prateleira. Foram realizados dois experimentos, onde no primeiro experimento objetivou-se caracterizar as mudanças nos conteúdos de CFT e CFI (ácido clorogênico, floridizina, quercetina 3-galactosídeo, epicatequina, catequina e procianidina B1 e B2) e na AAT, na casca e polpa, e de ANT na casca, durante o desenvolvimento dos frutos de macieiras ‘Brookfield[®]’ e ‘Mishima’ cultivadas em pomar comercial localizado no município de São Joaquim, SC. Maçãs da cultivar Brookfield[®] foram colhidas aos 49, 79, 107, 134 e 138 dias após a plena floração (DAPF), e da cultivar Mishima aos 45, 75, 103, 130, 145, 165 e 172 DAPF, na safra

2014/2015. O segundo experimento teve como objetivo avaliar o efeito da ACD monitorada pelo quociente respiratório e por fluorescência de clorofilas e de três condições de AC estática (1,2 kPa de O₂ + 1,2; 1,6; e 2,0 kPa de CO₂) sobre o conteúdo de CFI e CFT e sobre a AAT nas porções da casca e polpa, bem como sobre a manutenção da qualidade de maçãs ‘Galaxy’ armazenadas por nove meses e mais sete dias de prateleira. Os frutos foram colhidos em um pomar comercial em Vacaria, RS, na safra 2012/2013. As condições de armazenamento testadas foram: ACD-QR (0,21 kPa de O₂ + 1,2 kPa de CO₂), ACD-FC (0,4 kPa de O₂ + 1,2 kPa de CO₂) e três condições de AC estática (1,2 kPa O₂ combinado com 1,2; 1,6 e 2,0 kPa CO₂). Os frutos permaneceram armazenados por nove meses sob temperatura de 1,0 °C e UR de 94 ± 1% e avaliados após sete dias de exposição dos frutos em condições ambiente (20±1 °C e UR de 65±5%), simulando o período de comercialização. Foram avaliadas as taxas respiratória e de produção de etileno, firmeza de polpa, acidez titulável (AT), teor de sólidos solúveis (SS), conteúdo de CFT e CFI (ácido clorogênico, floridizina, quercetina 3-galactosídeo, epicatequina, catequina e procianidina B1 e B2) e AAT, nas porções de casca e polpa, incidência de escurecimento de polpa e polpa farinácea e a porcentagem de frutos sadios. O conteúdo de compostos fenólicos individuais e totais, assim como a atividade antioxidante total de maçãs ‘Brookfield®’ e ‘Mishima’ diminuiu ao longo do desenvolvimento dos frutos. A redução na polpa ocorreu em maior intensidade em relação à casca. Em ambas as cultivares, com o avanço do desenvolvimento, na casca, houve um incremento no conteúdo de quercetina 3-galactosídeo, epicatequina e procianianidina B2, coincidindo com o incremento no conteúdo de antocianinas totais. Em maçãs ‘Mishima’, este incremento refletiu em aumento no conteúdo de CFT e na AAT. De maneira geral, o armazenamento em ACD-QR e ACD-FC proporcionaram maior retardo do amadurecimento dos frutos, seguido pela

condição de AC estática com 2,0 kPa CO₂. O armazenamento em ACD resultou em frutos com maior conteúdo de compostos fenólicos totais na polpa em relação ao armazenamento em AC estática. A ACD-QR apresentou vantagens em relação às demais condições de armazenamento, por promover frutos com maior conteúdo de ácido clorogênico e procianidina B1 na casca e ácido clorogênico, epicatequina e catequina na polpa.

Palavras-chave: *Malus domestica*. Catequina. Quercetina 3-galactosídeo. Epicatequina. Procianidina. Ácido clorogênico. Fluorescência de clorofilas. Quociente respiratório.

ABSTRACT

STANGER, Mayara Cristiana. **Phenolic compounds and antioxidant activity of apples during fruit development and after storage in dynamic and static controlled atmosphere.** 2016. 107 f. Dissertation (Doctorate in Plant Science – Area: Postharvest Biology and Technology) – University of Santa Catarina State. Graduation Program in Vegetable Production, Lages, 2016.

This study aimed to characterize the changes in total phenolics content (TFC) and individual (IFC) and the total antioxidant activity (TAA), peel and pulp, and anthocyanins (TAN) in peel, during the development of fruits of apple trees 'Brookfield[®]' and 'Mishima', and evaluate the effect of controlled atmosphere storage dynamically monitored by the respiratory quotient (ACD-QR) and the fluorescence of chlorophyll (ACD-FC) and static controlled atmosphere (CA) on the content of CFI and CFT and AAT, in portions of the peel and pulp of 'Galaxy' apples and on fruit quality after storage and more 7 days of shelf live. Two experiments were conducted, where the first experiment aimed to characterize the changes in TCF and ICF content (chlorogenic acid, floridzina, quercetin 3-galactoside, epicatechin, catechin and procyanidin B1 and B2) and TAA, in peel and pulp, and ANT in peel during the development of the fruits of apple trees 'Brookfield[®]' and 'Mishima' grown in a commercial orchard located in São Joaquim, -SC. Apples grow Brookfield[®] were harvested at 49, 79, 107, 134 and 138 days after full bloom (DAFB) and cultivar Mishima at 45, 75, 103, 130, 145, 165 and 172 DAFB in season 2014/2015. The second experiment was conducted to evaluate the effect of DCA monitored by the respiratory quotient and chlorophyll

fluorescence and three static CA conditions (1,2 kPa O₂ + 1,2, 1,6, and 2,0 kPa CO₂) on the content of IFC and TFC and on the TAA in the portions of the peel and pulp, as well as maintaining the quality of apples 'Galaxy' after nine months of storage plus seven days of shelf life. The fruits were harvested in a commercial orchard in Vacaria, RS, in the 2012/2013 harvest. The storage conditions were: DCA-RQ (0,21 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂), DCA-CF (0,4 kPa 1,2 kPa O₂ + CO₂) and three CA static conditions (1,2 kPa O₂ combined with 1,2, 1,6 and 2,0 kPa CO₂). The fruits were stored for nine months at a temperature of 1,0 ° C and RH 94 ± 1% and evaluated after seven days of fruit exposure at ambient conditions (20 ± 1 ° C and RH 65 ± 5%), simulating the marketing period. They evaluated the respiratory and ethylene production rates, firmness, titratable acidity (TA), soluble solids (SS) content TFC and IFC (chlorogenic acid, floridzina, 3-galactoside quercetin, epicatechin, catechin and procyanidin B1 and B2) and TAA, in portions of peel and pulp, incidence of internal browning and mealy pulp and the percentage of healthy fruits. The content of individual and total phenolics and total antioxidant activity of apples 'Brookfield®' and 'Mishima' decreased over fruit development. The reduction in the pulp occurred in greatest intensity in relation to the peel. In both cultivars, with the advancement of development, the peel, there was an increase in the content of quercetin 3-galactoside, epicatechin and procyanidin B2, coinciding with the increase in the content of anthocyanins. In 'Mishima' apples, this increase reflected in an increase in the content of TFC and TAA. Generally, the DCA-RQ and DCA-CF storage provided greater delay the ripening of the fruit, followed by static CA condition with 2,0 kPa CO₂. The DCA storage resulted in fruit with higher content of phenolic compounds in the pulp compared to static CA storage. The DCA-RQ showed advantages over other storage conditions, to promote fruit with higher content of

chlorogenic acid and procyanidin B1 peel and chlorogenic acid, epicatechin and catechin in the pulp.

Keywords: *Malus domestica*. Catechin. Quercetin 3-galactoside. Epicatechin. Procyanidin. Chlorogenic acid. Fluorescence of chlorophyll. Respiratory quotient.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total determinada pelos métodos DPPH e ABTS, nos tecidos de casca e polpa, durante o desenvolvimento de maçãs 'Brookfield®'. Letras diferentes no interior do gráfico, demonstram diferenças significativas entre épocas de análise dos frutos, determinadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão da média.....56
- Figura 2 - Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total determinada pelos métodos DPPH e ABTS, nos tecidos de casca e polpa, durante o desenvolvimento de maçãs 'Mishima'. Letras diferentes no interior do gráfico, demonstram diferenças significativas entre épocas de análise dos frutos, determinadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão da média.....59
- Figura 3 - Mudanças na composição de antocianinas totais (mg cianidina 3-glicosídeo 100 g^{-1} MF de casca), durante o desenvolvimento dos frutos de maçãs 'Brookfield®' e 'Mishima'. Letras diferentes no interior do gráfico, demonstram diferenças significativas entre épocas de análise dos frutos, determinadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão da média.....63
- Figura 4 - Conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total (métodos DPPH e

ABTS), nos tecidos de casca e polpa, em maçãs ‘Galaxy’ armazenadas por nove meses em diferentes condições de armazenamento, seguidos por mais sete dias de exposição em condições ambiente (20 ± 1 °C e UR de $65\pm 5\%$). ACD-QR= 1,5 (0,21 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂); ACD-FC: ACD por fluorescência de clorofilas (0,4 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂); AC (1,2 kPa O₂ + 1,2; 1,6; e 2,0 kPa CO₂)79

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Conteúdo de compostos fenólicos (mg kg^{-1} MF), na casca e polpa, durante o desenvolvimento (dias após a plena floração - DAPF) de maçãs 'Brookfield®'57
- Tabela 2 - Conteúdo de compostos fenólicos (mg kg^{-1} MF) durante o desenvolvimento (dias após a plena floração - DAPF) de maçãs 'Mishima'60
- Tabela 3 - Coeficientes de correlação de Pearson entre compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante total (AAT), quantificada pelos métodos ABTS e DPPH, nas porções casca e polpa, em maçãs 'Brookfield®' e 'Mishima' durante o desenvolvimento.....64
- Tabela 4 - Conteúdo de compostos fenólicos (mg kg^{-1} MF) em maçãs 'Galaxy' armazenadas por nove meses em atmosfera controlada dinâmica (ACD) e atmosfera controlada estática (AC) e seguidos por mais sete dias de exposição em condições ambiente (20 ± 1 °C e UR de $65\pm 5\%$).....80
- Tabela 5 - Incidência de distúrbios fisiológicos em maçãs 'Galaxy' armazenadas por nove meses em atmosfera controlada dinâmica (ACD) e atmosfera controlada estática (AC) e seguidos por mais sete dias de exposição em condições ambiente (20 ± 1 °C e UR de $65\pm 5\%$).....85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Atividade antioxidante total
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AC	Atmosfera controlada
ACD	Atmosfera controlada dinâmica
ACD-FC	Atmosfera controlada dinâmica monitorada por fluorescência de clorofilas
ACD-QR	Atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório
ANT	Antocianinas totais
AT	Acidez titulável
°C	Graus Celsius
C. V.	Coefficiente de variação
CFI	Compostos fenólicos individuais
CFT	Compostos fenólicos totais
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPF	Dias após a plena floração
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EAG	Equivalente de ácido gálico
FC	Fluorescência de clorofilas
g	Gramas
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
<i>h</i> ^o	Ângulo 'hue'
kPa	Quilo Pascal
λ	Lambda (unidade de comprimento de onda)
m	Metro
m ³	Metro cúbico
MF	Massa fresca
mg	Miligramas

min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
mM	Milimolar
N	Newton (unidade de firmeza de polpa)
N	Normal (concentração de solução química)
ND	Não detectado
nm	Nanômetro
ns	Não significativo
O ₂	Oxigênio
p	Probabilidade
pH	Potencial hidrogeniônico
PPO	Enzima polifenol oxidase
QR	Quociente respiratório
r	Coefficiente de correlação de Pearson
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RS	Rio Grande do Sul
S	Sul
SAS	Statistical analysis system
SC	Santa Catarina
SS	Sólidos solúveis
TEAC	Equivalente de Trolox
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
UR	Umidade relativa do ar
UV	Ultra-violeta
v	Volume
W	Oeste
μ Mol	Micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	35
2	CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE MAÇÃS ‘BROOKFIELD®’ E ‘MISHIMA’	43
2.1	RESUMO	43
2.2	ABSTRACT	44
2.3	INTRODUÇÃO	46
2.4	MATERIAL E MÉTODOS	47
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
2.6	CONCLUSÃO	64
3	CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM MAÇÃS ‘GALAXY’ ARMAZENADAS EM ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA E ESTÁTICA	65
3.1	RESUMO	65
3.2	ABSTRACT	66
3.3	INTRODUÇÃO	68
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	70
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.6	CONCLUSÃO	86
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os temas relacionando saúde e alimentação assumiram destaque na sociedade contemporânea. Há uma crescente preocupação da população em relação à alimentação saudável com a finalidade de prevenir problemas de saúde. As frutas e vegetais são ricos em compostos que desempenham funções antioxidantes, os quais estão associados à potencialização dos efeitos promotores da saúde humana através da prevenção de várias doenças. A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016), recomenda o consumo de cinco porções diárias de frutas e vegetais pela atividade antioxidante destes compostos terem sido associadas à potencialização dos efeitos promotores da saúde humana através da prevenção de várias doenças.

As reações bioquímicas normais do corpo humano, bem como o aumento da exposição à infecções microbianas, poluentes, toxinas, álcool, radiações ionizante, UV, pesticidas e ozônio, resultam na produção de espécies reativas de oxigênio (POLJSAK; DUŠAN ŠUPUT; MILISAV, 2013). Os radicais são substâncias químicas reativas com um elétron desemparelhado (POWELL, 1993). As espécies reativas de oxigênio (ROS) compreendem moléculas tais como superóxido (O_2^-), radical hidroxila (HO^*), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE.; CROSS, 1992; RILEY, 1994), que podem aumentar o estresse oxidativo e prejudicar o equilíbrio redox (POLJSAK; DUŠAN ŠUPUT; MILISAV, 2013). O estresse oxidativo é definido por Poljsak, Dušan Šuput e Milisav (2013) como uma quantidade excessiva de ROS, resultante do desequilíbrio entre produção e destruição de ROS, sendo desse modo, consequência do aumento da produção de radicais e/ou reduzida atividade fisiológica das defesas antioxidantes contra os radicais. As ROS podem causar dano oxidativo em várias moléculas do organismo humano, tais como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, e originar doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, asma e diabetes

(KALINOWSKA et al., 2014). A homeostase celular pode ser mantida pela defesa antioxidante endógena, que inclui enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione (GSH), proteínas e sequestrantes de baixo peso molecular, como o ácido úrico, coenzima Q e o ácido lipóico (HALLIWELL, 2011). O estresse oxidativo pode ainda ser neutralizado através do reforço das defesas celulares, pela ingestão de certos compostos antioxidantes. Os antioxidantes não enzimáticos, como as vitaminas C e E, carotenoides e compostos fenólicos, são atualmente considerados os principais antioxidantes exógenos (SHAHIDI; ZHONG, 2010; POLJSAK; DUŠAN ŠUPUT; MILISAV, 2013), que atuam interrompendo as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (POLJSAK; DUŠAN ŠUPUT; MILISAV, 2013). O consumo de alimentos ricos em antioxidantes tem efeito preventivo, pois estes compostos possuem capacidade de reduzir o estresse oxidativo pela eliminação direta de espécies reativas de oxigênio (PANZELLA et al., 2013), complexação de íons metálicos (FLORA, 2009) e modulação da resposta celular (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001).

As maçãs são apontadas como uma das frutas mais consumidas regularmente em muitos países (BOYER; LIU, 2004). Estima-se que 22% dos compostos fenólicos dietéticos consumidos nos EUA são provenientes de maçãs (VINSON et al., 2001) e na França 37% (BRAT et al., 2006). Na Europa o consumo de maçãs é de 62 g dia⁻¹, sendo considerada como a fruta mais popular pela relação positiva entre preço e benefícios à saúde (HARKER; GUNSON; JAEGER, 2003). No Brasil, em 2013, foram produzidas 1,2 milhões de toneladas, numa área colhida de 37.579 hectares, com produtividade média de 32,2 t ha⁻¹ (FAO, 2016). As cultivares Gala e Fuji e seus clones coloridos correspondem a 52 e 38%, respectivamente, do total produzido (ABPM, 2014). Segundo dados da FAO (2016), em 2013, o consumo *per capita* de

maçãs pelos brasileiros foi de $5,0 \text{ kg}^{-1}\text{habitante}^{-1}\text{ano}^{-1}$. Embora o consumo ainda seja baixo, se comparado ao de países como Argentina ($14,6 \text{ kg}^{-1}\text{habitante}^{-1}\text{ano}^{-1}$) e Chile ($8,7 \text{ kg}^{-1}\text{habitante}^{-1}\text{ano}^{-1}$), e baixíssimo, quando comparado a países como Estados Unidos ($15,9 \text{ kg}^{-1}\text{habitante}^{-1}\text{ano}^{-1}$) e Reino Unido ($27,3 \text{ kg}^{-1}\text{habitante}^{-1}\text{ano}^{-1}$) (FAO, 2016), a maçã é a terceira fruta mais consumida pelos brasileiros (IBGE, 2009), portanto, têm importante contribuição no aporte de antioxidantes oriundos da dieta.

A coloração vermelha de maçãs é de relevante interesse para fruticultores e comerciantes, devido a preferência dos consumidores brasileiros por frutos com esta característica. ‘Brookfield[®]’ é uma mutação espontânea de ‘Royal Gala’ descoberta em 1994, na Nova Zelândia (NORTON; WAY, 1999). Esta cultivar apresenta desenvolvimento de cor de fruto vermelho vivo antecipado comparado à ‘Royal Gala’ e padrão de coloração constituído de faixas vermelho-escuras destacadas, intercaladas com listras de cor de fundo presentes sobre toda a superfície do fruto (HOSSAIN et al., 2002). Iglesias, Echeverría e Soria (2008) e González-Talice et al. (2013), observaram coloração mais intensa na comparação com ‘Galaxy’. Segundo Fioravanzo, Czermainski e Oliveira (2013), a área cultivada com ‘Brookfield’ vem aumentando na região Sul do Brasil devido, dentre outras vantagens agronômicas, boa produtividade, elevada qualidade dos frutos, principalmente em relação à uniformidade e a intensidade de coloração da casca. A ‘Galaxy’ é uma mutação de ‘Royal Gala’, ocorrida em Hawke’s Bay na Nova Zelândia, em 1985 (KIDDLE, 1989). Os frutos desta cultivar apresentam estrias uniformemente distribuídas em toda a superfície do fruto, inclusive na parte sombreada. A cultivar Mishima é uma mutação espontânea de ‘Fuji’, descoberta em 1978 por Y. Sasaki, em Akita no Japão (KOMATSU, 1998). Os frutos apresentam a cor vermelha na epiderme, recobrando quase que totalmente a superfície, sobre fundo esverdeado, sendo considerada mais uma opção para a

composição de pomares, em função da similaridade de comportamento em relação à ‘Fuji Suprema’ e ‘Fuji Select’ (FIORAVANÇO et al., 2012).

O consumo de maçãs está relacionado à prevenção de várias doenças crônicas. Extratos de maçã têm demonstrado atividade na prevenção de doenças cardiovasculares (SETORKI et al., 2009), diabetes tipo II (SONG et al., 2005), oxidação do colesterol LDL (VIDAL et al., 2005), e de diversos tipos de câncer como leucemia, ovário, mama, pulmão, fígado, boca (RAMOS, 2007) e cólon (VEERIAH et al., 2007). Ação antiviral (HE et al., 2011), anti-inflamatória (ANDRE et al., 2012), antiobesidade (BOQUÉ et al., 2013), proteção da mucosa intestinal (CARRASCO-POZO et al., 2011) e ação anti-hipertensiva (BALASURIYA; RUPASINGHE, 2012).

O ácido ascórbico (vitamina C) é um potente antioxidante hidrossolúvel (NIMSE; PAL, 2015). No entanto, estudos demonstram que menos de 0,4% da atividade antioxidante em maçãs é atribuído ao teor de ácido ascórbico, indicando que outras moléculas orgânicas, tais como compostos fenólicos, são os principais contribuintes (TSAO et al., 2005; DROGOUDI; MICHAILIDIS; PANTELIDIS, 2008). Os compostos fenólicos possuem um ou mais anéis aromáticos, com um ou mais grupamentos hidroxila (BOUAYED et al., 2011; LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO, 2011), são provenientes do metabolismo secundário e desempenham funções essenciais na bioquímica celular, reprodução, crescimento, mecanismos de defesa (contra patógenos, parasitas e predadores), coloração e sabor dos frutos (HYSON, 2011; PALAFOX-CARLOS; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011). Já em animais e humanos tem-se observado que são capazes de reagir com radicais livres, formando radicais estáveis. Esse poder de neutralização dos radicais pelos compostos fenólicos é devido à sua estrutura

química formada por pelo menos um anel aromático com grupamentos hidroxilas (GIADA; MANCINI-FILHO, 2006).

Em maçãs os compostos fenólicos são classificados em compostos não-flavonoides e flavonoides. No grupo de compostos não-flavonoides fazem parte os ácidos fenólicos, dos quais os ácidos hidroxicinâmicos são os principais representantes (PETKOVSEK; STAMPAR; VEBERIC, 2007). Dentre os ácidos hidroxicinâmicos, o ácido clorogênico tem sido o ácido identificado em maior quantidade, tanto na polpa quanto na casca em diferentes cultivares de maçã (LEE et al., 2003; TSAO et al., 2003; PETKOVSEK; STAMPAR; VEBERIC, 2007). No grupo dos flavonoides estão as dihidrochalconas, flavonois, flavanois, assim como as antocianinas em cultivares vermelhas (LEE et al., 2003; TSAO et al., 2003, TSAO et al., 2005). As principais dihidrochalconas são a floridizina e floretina e frequentemente estão associadas a açúcares (TSAO et al., 2003). Os flavonois, considerados quantitativamente a menor classe de compostos fenólicos em maçãs, são encontrados majoritariamente na casca e frequentemente ligados a açúcares, sendo a quercetina 3-glicosídeo a principal representante deste grupo (WOJDYLO; OSZMIANSKI; LASKOWSKI, 2008). Os flavan-3-óis são os principais flavanois e quantitativamente a maior classe de compostos fenólicos presentes na maçã, 56% e 60% dos polifenóis na polpa e casca, respectivamente, podendo ser encontrados nas formas monoméricas, (+)-catequina e a (-)-epicatequina, sendo os dímeros procianidinas B1 e B2 de maior destaque em maçãs (TSAO et al., 2005). A cianidina 3-galactosídeo é a antocianina presente em maior quantidade em cultivares de maçãs vermelhas ou parcialmente vermelhas, sendo responsável pela coloração característica das mesmas (TSAO et al., 2005; IGLESIAS; ECHEVERRÍA; SORIA, 2008).

A capacidade antioxidante e os compostos fenólicos totais não estão uniformemente distribuídos nos tecidos da

maçã. Trabalhos evidenciaram maior quantidade de polifenóis na casca em relação à polpa (FELICETTI; MATTHEIS, 2010; KEVENS et al., 2011; VIEIRA et al., 2011). Os valores podem ainda variar entre cultivares (CEYMANN et al., 2012; JAKOBEK et al., 2013; PANZELLA et al., 2013). A capacidade antioxidante pode ser de 4 a 15 vezes maior na casca em relação à polpa, o que se justifica pela presença de antocianinas, floridizina e glicosídeos da quercetina (LATA; TRAMPCZYNSKA; PACZESNA, 2009). Em maçãs 'Pink Lady' produzidas na Austrália, os fenóis quantificados na casca foram flavan-3-óis monoméricos (35%), procianidinas (27%), flavonois (14%), antocianinas (12%), ácidos fenólicos (8,5%) e chalconas (3%), e na polpa ácidos fenólicos (57%), flavan-3-óis monoméricos (19,5%), procianidina B2 (17,5%) e floridizina (5,5%) (HOANG; GOLDING; WILKES, 2011). Vieira et al. (2011) em 14 cultivares produzidas no Brasil, identificaram valores de compostos fenólicos totais entre 128 e 212 mg EAG 100g⁻¹ de massa fresca e entre 304 e 712 mg EAG 100g⁻¹ de massa fresca na polpa e casca, respectivamente.

O conteúdo de compostos fenólicos em maçãs pode variar em função de fatores como ano de produção (McGHIE; HUNT; BARNETT, 2005), manejo do pomar (LAMPERI et al., 2008; VALAVANIDIS et al., 2009), posição do fruto no dossel da planta (DROGOUDI; PANTELIDIS, 2011), cultivar (KEVERS et al., 2011; VIEIRA et al., 2011), estágio de desenvolvimento (ZHANG; LI; CHENG, 2010; ZHENG; KIM; CHUNG, 2012), estágio de maturação na colheita (McGHIE; HUNT; BARNETT, 2005), condições de armazenagem (HOANG; GOLDING; WILKES, 2011; KEVERS et al., 2011) e da utilização de inibidores da ação do etileno (HOANG; GOLDING; WILKES, 2011).

O conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante total depende do estágio de desenvolvimento. Em maçãs 'Fuji' colhidas na Coreia, a atividade antioxidante e os polifenóis totais diminuíram drasticamente aos 85 dias após a

plena floração (DAPF), principalmente pela redução do ácido clorogênico na polpa dos frutos (ZHENG; KIM; CHUNG, 2012). Com base no peso fresco de maçãs ‘Honeycrisp’ produzidas na China, Zhang, Li e Cheng (2010) observaram uma redução exponencial nas concentrações de floridizina, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina, isoquercetina, rutina e flavonóis com o desenvolvimento dos frutos. Já as concentrações de procianidina B1 e B2, catequina, epicatequina, e ácido gálico mantiveram-se inalteradas ou aumentaram ligeiramente no estágio inicial de desenvolvimento e, em seguida, houve redução exponencial desses compostos até a colheita dos frutos. Em maçãs ‘Braeburn’, o incremento no conteúdo de antocianinas totais ocorreu entre duas 2 e 4 semanas antecedentes à maturação comercial (BIZJAK et al., 2013 a, b).

Com intuito de prolongar a oferta e atender ao mercado consumidor, diversos métodos têm sido propostos para ampliar a conservação pós-colheita de maçãs. O armazenamento de maçãs em atmosfera controlada estática (AC), com baixo O₂ (0,8 a 1,2 kPa) e alto CO₂ (2,0 a 3,0 kPa), é a principal tecnologia complementar à refrigeração atualmente usada para a conservação pós-colheita de maçãs (BRACKMANN et al., 2010). A AC estática reduz o metabolismo dos frutos, conserva atributos físico-químicos e reduz e/ou inibe a ocorrência de distúrbios fisiológicos (GWANPUA et al., 2012; BOTH et al., 2014a). Em AC estática, o aumento dos níveis de CO₂ demonstrou ser benéfico na redução do metabolismo e manutenção da qualidade dos frutos. Para as maçãs do grupo ‘Gala’, o nível de CO₂ recomendado é entre 2,0 e 3,0 kPa (BRACKMANN et al., 2001). Brackmann, Weber e Both (2015) afirmaram que o armazenamento com 2,0 kPa de CO₂ é mais apropriado para a manutenção da qualidade desta cultivar, em relação ao armazenamento com 1,2 e 1,6 kPa de CO₂.

O uso da atmosfera controlada dinâmica (ACD) tem sido proposta como complemento à AC estática. Na ACD o

limite inferior de O_2 é adaptado de forma dinâmica, em função do tempo de armazenamento, com base na medida de uma resposta biológica do fruto armazenado para baixos níveis de oxigênio (ZANELLA, 2003). A atmosfera controlada dinâmica monitorada pela fluorescência de clorofilas (ACD-FC) (WRIGHT et al., 2010; WRIGHT et al., 2012) e a atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório (ACD-QR) (BESSEMANS et al., 2016), são metodologias propostas para detectar o limite de baixo oxigênio tolerado pelos frutos. Em relação à AC estática, o armazenamento ACD-FC demonstrou reduzir a taxa de produção de etileno, a perda de firmeza de polpa e o escurecimento interno de maçãs ‘Royal Gala’ e ‘Galaxy’ (THEWES et al., 2015). Em maçãs ‘Granny Smith’, a ACD-QR reduziu a perda de firmeza de polpa e a incidência de escaldadura superficial, em relação à AC estática (BESSEMANS et al., 2016). Brackmann, Weber e Both (2015) afirmam que o armazenamento de maçãs ‘Galaxy’ em ACD-QR resulta em frutos com melhor qualidade em relação à ACD-FC.

Nas condições edafoclimáticas brasileiras de produção não existem trabalhos reportando a dinâmica dos polifenóis e da atividade antioxidante em função do estágio de desenvolvimento e da utilização de tecnologias de conservação pós-colheita. Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as mudanças no conteúdo de compostos fenólicos individuais e totais, antocianinas totais e atividade antioxidante total, nas porções da casca e polpa, que ocorrem durante o desenvolvimento dos frutos de macieiras ‘Brookfield®’ e ‘Mishima’ e avaliar o efeito da ACD monitorada pelo quociente respiratório e por fluorescência de clorofilas e de três condições de AC estática (1,2 kPa de O_2 + 1,2; 1,6; e 2,0 kPa de CO_2) sobre o conteúdo de compostos fenólicos individuais e totais e sobre atividade antioxidante total, nas porções da casca e polpa, bem como sobre a manutenção da qualidade de

maçãs ‘Galaxy’ armazenadas por nove meses e mais sete dias de prateleira.

2 CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE MAÇÃS ‘BROOKFIELD®’ E ‘MISHIMA’

2.1 RESUMO

Maçãs contêm uma série de compostos bioativos responsáveis por promover a saúde humana, dentre os quais destacam-se os compostos fenólicos, principais responsáveis pela atividade antioxidante dos frutos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as mudanças nos conteúdos de compostos fenólicos totais (CFT) e individuais (CFI; ácido clorogênico, floridizina, quercetina 3-galactosídeo, epicatequina, catequina e procianidina B1 e B2) e na atividade antioxidante total (AAT), na casca e polpa, e de antocianinas totais (ANT) na casca, durante o desenvolvimento dos frutos de macieiras ‘Brookfield®’ e ‘Mishima’, cultivadas em pomar comercial localizado no município de São Joaquim-SC. Maçãs da cultivar Brookfield® foram colhidas aos 49, 79, 107, 134 e 138 dias após a plena floração (DAPF), e da cultivar Mishima aos 45, 75, 103, 130, 145, 165 e 172 DAPF. Na polpa, os conteúdos de CFI e CFT e a AAT reduziram rapidamente aos 75 e 79 DAPF para ‘Brookfield®’ e ‘Mishima’, respectivamente, permanecendo constantes até a maturação comercial. Na casca de maçãs ‘Brookfield®’, houve redução no conteúdo de CFT e na AAT até 79 DAPF, com manutenção nos conteúdos de ácido clorogênico, catequina e procianidina B1 desta data até a maturação comercial, e no conteúdo de floridizina de 107 DAPF até a maturação comercial. Os conteúdos de quercetina 3-galactosídeo, epicatequina e procianidina B2 reduziram até 107 DAPF, com posterior incremento, apresentando na

maturação comercial, valores semelhantes ao início do desenvolvimento dos frutos (45 DAPF). Na casca de maçãs ‘Mishima’, houve redução no conteúdo de CFT e da AAT até 130 DAPF, com posterior incremento até a maturação comercial. Até 103 DAPF houve redução nos conteúdos de ácido clorogênico, floridizina e catequina, seguida de manutenção até a maturação comercial. Os conteúdos de quercetina 3-galactosídeo, epicatequina e procianidinas B1 e B2 reduziram até 130 DAPF, com posterior incremento até a maturação comercial. O conteúdo de ANT na casca aumentou nas duas e quatro semanas antecedentes à maturação comercial, para ‘Brookfield®’ e ‘Mishima’, respectivamente. Com o avanço do desenvolvimento, na polpa e na casca de ambas as cultivares, há redução de CFI e CFT, e da AAT. Próximo à maturação comercial, houve incremento nos conteúdos na casca de quercetina 3-galactosídeo, epicatequina, procianidina B2 e ANT, em ambas as cultivares.

Palavras-chave: *Malus domestica*. Dias após a plena floração. Cromatografia líquida. Polifenóis. Antocianinas.

PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY DURING THE DEVELOPMENT OF APPLES ‘BROOKFIELD®’ AND ‘MISHIMA’

2.2 ABSTRACT

Apples contain a number of bioactive compounds responsible for promoting human health, among which is the phenolic compounds, mainly responsible for antioxidant activity of fruit. The aim of this study was to characterize the changes in the content of phenolic compounds (TFC) and individual (IFC; chlorogenic acid, floridizina, quercetin 3-galactoside, epicatechin, catechin and procyanidin B1 and B2) and total antioxidant activity (TAA) in the peel and pulp, and

anthocyanins (TAN) in the peel during the development of the fruits of apples 'Brookfield[®]' and 'Mishima', grown in commercial orchard located in São Joaquim-SC. Apples 'Brookfield[®]' were harvested at 49, 79, 107, 134 and 138 days after full bloom (DAFB) and 'Mishima' at 45, 75, 103, 130, 145, 165 and 172 DAFB. In pulp content IFC and TFC and TAA rapidly reduced to 75 and 79 to DAFB 'Brookfield[®]' and 'Mishima', respectively, being equal to the commercial maturity. In peel apples 'Brookfield[®]', there was a reduction in the content of TFC and TAA up to 79 DAFB, maintaining the chlorogenic acid content, catechin and procyanidin B1 of this date to the commercial maturity, and floridizina content of 107 to DAFB commercial maturity. The quercetin 3-galactoside content, epicatechin and procyanidin B2 reduced to 107 DAFB with subsequent increase, with the commercial maturity, values similar to the early development of fruit (45 DAFB). In peel apples 'Mishima', there was a reduction in the content of CFT and AAT DAFB to 130, with subsequent increase to the commercial maturity. Up to 103 DAFB there was a reduction in chlorogenic acid content, floridizina and catechin, followed by maintenance to commercial maturity. The quercetin-3-galactoside content, epicatechin and procyanidins B1 and B2 reduced to 130 DAFB, with subsequent increment up to commercial maturity. TAN content in the peel increased in two and four weeks prior to the commercial maturity, for 'Brookfield[®]' and 'Mishima', respectively. With the advancement of development in the pulp and peel of both cultivars, there is a reduction of IFC and TFC, and TAA. Near commercial maturity, there is an increase in content in the peel of quercetin 3-galactoside, epicatechin, procyanidin B2 and ANT in both cultivars.

Keywords: *Malus domestica*. Days after full bloom. Liquid chromatography. Polyphenols.

2.3 INTRODUÇÃO

As maçãs são as frutas de clima temperado mais populares em termos de área cultivada e volume consumido. Estudos recentes reportam os efeitos positivos do consumo de maçãs à potencialização dos efeitos promotores da saúde humana pela prevenção de doenças crônicas (HYSON, 2011; LI et al., 2012; CONDEZO-HOYOS; MOHANTY; NORATTO, 2014). Esses efeitos benéficos têm sido atribuídos aos compostos fenólicos e ao seu efeito antioxidante (BOUAYED, 2010; BOUAYED; BOHN, 2010).

Os compostos fenólicos possuem um ou mais anéis aromáticos, com um ou mais grupamentos hidroxila (BOUAYED et al., 2011; LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO, 2011), são provenientes do metabolismo secundário e desempenham funções essenciais na bioquímica celular, reprodução, crescimento, mecanismos de defesa (contra patógenos, parasitas e predadores), coloração e sabor dos frutos (HYSON, 2011; PALAFOX-CARLOS; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011).

Os principais grupos de compostos fenólicos em maçãs são os ácidos fenólicos, di-hidrochalconas, flavonóis, flavanóis (flavan-3-óis), e antocianinas (CEYMANN et al., 2012; JAKOBEK et al., 2013). De acordo com os trabalhos de Jakobek et al. (2013), Ceymann et al. (2012) e Tsao et al. (2005), os ácidos fenólicos, di-hidrochalconas e flavonóis contribuem, respectivamente, com valores de 3-30%, 1-5% e 2-10% do conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) em maçãs. Já os flavan-3-óis nas formas monoméricas [(+)-catequina e (-)-epicatequina] e oligomérica (proantocianidinas) são os principais flavanóis, e contribuem com 55-85% do conteúdo de CFT em maçãs. As antocianinas estão presentes em cultivares de maçãs vermelhas ou parcialmente vermelhas, e sua contribuição varia de 1-7% do conteúdo de CFT.

Trabalhos demonstraram que o conteúdo de CFT na casca (BIZJAK et al., 2013 a,b) e na polpa (ZHANG; LI;

CHENG, 2010; ZHENG; KIM; CHUNG, 2012), diminuem com o desenvolvimento do fruto, permanecendo relativamente constantes até a maturação comercial. Na casca, alguns compostos específicos, como as antocianinas em cultivares coloridas e as quercetinas glicosiladas, aumentam próximo da maturação dos frutos (BIZJAK et al., 2013 a,b). O conteúdo de CFT pode variar ainda entre cultivares de maçãs (CEYMANN et al., 2012; JAKOBEK et al., 2013; PANZELLA et al., 2013). Nas condições edafoclimáticas de produção no Sul do Brasil, não existem trabalhos reportando a dinâmica de CFT e da atividade antioxidante total (AAT) durante o desenvolvimento dos frutos, em clones das cultivares Gala e Fuji, que representam 90% do total produzido (PETRI et al., 2011). As cultivares Brookfield® e Mishima, são clones mutantes de ‘Gala’ e ‘Fuji’, respectivamente, e têm como principal característica a coloração vermelha intensa, de interesse para fruticultores, comerciantes e consumidores.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar as mudanças no conteúdo de compostos fenólicos individuais e totais, antocianinas totais e atividade antioxidante total, nas porções da casca e polpa, que ocorrem durante o desenvolvimento dos frutos de macieiras ‘Brookfield®’ e ‘Mishima’.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Maçãs ‘Brookfield®’ e ‘Mishima’ foram colhidas em um pomar comercial, localizado no município de São Joaquim-SC (28°17’ S e 49°55’ W, com altitude 1.360 m), na safra 2014/2015. O pomar era constituído por plantas com sete anos de idade, sobre porta-enxerto Marubakaido, espaçadas em 2,0 m x 6,0 m e 2,5 m x 6,0 m, para ‘Brookfield®’ e ‘Mishima’, respectivamente. Os frutos foram colhidos aos 49, 79, 107, 134 e 138 dias após a plena floração (DAPF) na cultivar Brookfield®, e aos 45, 75, 103, 130, 145, 165 e 172 DAPF na cultivar Mishima.

Reagentes, padrões e solventes

Os reagentes 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), Folin-Ciocalteu, acetato de sódio e persulfato de potássio foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), com grau analítico (PA). Os padrões de ácido clorogênico, catequina, epicatequina, procianidina B1, procianidina B2, quercetina 3-galactosídeo e floridizina, e os solventes acetonitrila, ácido acético e metanol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), todos com grau de pureza HPLC. Ácido gálico, carbonato de sódio, acetona e álcool etílico foram obtidos da Vetec[®] (Rio de Janeiro, Brasil), com grau analítico (PA).

Preparação das amostras

Para cada data de colheita e para cada cultivar, foram preparadas, em laboratório, quatro unidades amostrais homogêneas de 20 frutos, de forma casualizada, descartando frutos com podridões, lesões e defeitos. A casca de toda superfície foi removida com uma lâmina cortante (1 mm de espessura). A amostra de polpa foi retirada por meio de uma fatia longitudinal, de cerca de um centímetro, da porção mediana do fruto, descartando a região do endocarpo e conservando cada lado da fatia. As amostras de polpa foram processadas com um triturador vertical, marca Philips Walita, modelo RI1364 (Varginha, Brasil), e as amostras de casca foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido.

Obtenção dos extratos para quantificação de CFT e AAT

A obtenção do extrato para a quantificação de CFT e AAT foi realizada conforme descrito por Rufino et al. (2007), adaptado de Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997). Foram utilizadas 10,0 g de polpa e 2,5 g de casca. A amostra foi colocada em um tubo Falcon (Zollstr, Suíça) adicionando-se 10

mL de metanol/água destilada (50:50, v/v), com posterior homogeneização em ultraturrax, marca Heidolph, modelo D-91126 (Schwabach, Alemanha) e repouso por 60 min à temperatura ambiente. Após, as amostras foram centrifugadas a 12.880 g por 20 min à 4 °C, em uma centrífuga Eppendorf, modelo 5810R (Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e ao resíduo da primeira extração, foram adicionados 10 mL de acetona/água destilada (70:30, v/v), com posterior homogeneização e repouso por 60 min à 20 °C. As amostras foram submetidas à nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi transferido para o balão volumétrico contendo o primeiro sobrenadante e o volume foi completado para 25 mL com água destilada.

Determinação do conteúdo de CFT na casca e na polpa

O conteúdo de CFT foi determinado usando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu modificado, descrito por Roesler et al. (2007). Foi adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu/água destilada (25:75, v/v) à 0,5 mL de uma diluição conhecida do extrato hidroalcolico, em triplicata, em um tubo de ensaio, seguido de homogeneização em agitador de tubos, marca Arsec, modelo ATS-100 (São Paulo, Brasil), e manutenção durante 3 min à 20 °C para a reação. Em seguida, foi adicionado 2,0 mL de solução de carbonato de sódio (10 g 100 mL⁻¹), e as amostras novamente agitadas e mantida em repouso durante 1 hora ao abrigo da luz. A absorbância foi determinada no comprimento de onda (λ) de 765 nanômetros (nm), em espectrofotômetro UV-visível, marca Bel Photonics, modelo BEL2000-UV (Piracicaba, Brasil). O conteúdo de CFT foi calculado a partir da curva de calibração, preparada com ácido gálico e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes ácido gálico por 100 g de massa fresca (mg EAG 100 g⁻¹ MF).

Determinação da AAT na casca e na polpa

A AAT foi determinada utilizando as metodologias baseadas na capacidade do extrato de sequestrar os radicais 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (método ABTS) (RUFINO et al., 2007) e 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (método DPPH) (BRAND-WILLIANS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Para o método ABTS, o radical foi gerado a partir da reação da solução estoque de ABTS (7 mM) com o persulfato de potássio (140 mM), mantido no escuro por 16 h, à 20 °C. Antes da análise, o radical foi diluído com álcool etílico até obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$, no $\lambda=734$ nm. O radical ABTS foi diluído em etanol até obter-se uma medida de absorbância de $0,70 (\pm 0,05)$ no $\lambda=734$ nm. A partir do extrato hidroalcoólico, foram preparadas, em tubos de ensaio, três diluições diferentes, em triplicata. Foram transferidas alíquotas de 30 μ L de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS, e homogeneizadas em agitador de tubos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível, marca Bel Photonics, modelo BEL2000-UV (Piracicaba, Brasil), no $\lambda=734$ nm, após 6 min de reação. Foi utilizado álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, foi obtida a equação da reta. Curvas com soluções padrões de Trolox foram construídas e os resultados de AAT foram expressos em equivalente de Trolox (TEAC) por g de massa fresca (μ Mol TEAC g^{-1} MF).

Para o método DPPH, o radical (0,06 mM) foi preparado no dia da avaliação, diluído em metanol. Foi transferida uma alíquota de 0,1 mL do extrato hidroalcoólico para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH, em triplicata, com posterior homogeneização em agitador de tubos. A medida de absorbância foi realizada no $\lambda=515$ nm, após 30 min de reação com adição da amostra. Foi utilizado álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro.

Curvas com soluções padrões de Trolox foram construídas, e os resultados de AAT foram expressos em $\mu\text{Mol TEAC } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

Determinação de ANT na casca

As ANT foram determinadas conforme metodologia adaptada por Fuleki e Francis, (1968). Para determinação de ANT, foi utilizado 5,0 g de amostra de casca, adicionado a 15 mL de etanol/água destilada (95:5, v/v), acidificado com etanol/ácido clorídrico (HCl, 1,5 N) (85:15, v/v). As amostras foram homogeneizadas em ultraturrax, marca Heidolph, modelo D-91126 (Schwabach, Alemanha), mantidas durante 24 h a 4 °C, e posteriormente centrifugadas durante 20 min a 12.880 g, a 4 °C, em uma centrífuga Eppendorf, modelo 5810R (Hamburgo, Alemanha). Foi transferido 2 mL do sobrenadante para um balão volumétrico e completado o volume para 50 mL com o solvente extrator. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível, marca Bel Photonics, modelo BEL2000-UV (Piracicaba, Brasil), no $\lambda=535 \text{ nm}$. A ANT foi expressa em mg cianidina 3-glicosídeo por 100 g de massa fresca ($\text{mg cianidina } 3\text{-glicosídeo } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$).

Determinação de CFI na casca e polpa

As análises de CFI foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito por Tsao et al. (2003). A preparação das amostras foi a mesma utilizada para CFT e AAT. Cada amostra foi transferida para um becker com metanol/água ultrapura (70:30, v/v), na proporção de 1:1 (p/v), onde foram homogeneizadas usando um ultraturrax marca Heidolph, modelo D-91126 (Schwabach, Alemanha). A filtragem foi realizada por filtro quantitativo sob vácuo e, em seguida, por um filtro de seringa de 0,45 μm , marca Kasvi (Curitiba, Brasil). A amostra final permaneceu armazenada a -20 °C até a análise.

A quantificação de CFI foi realizada através de CLAE, com um cromatógrafo da marca Shimadzu (Tóquio, Japão), equipado com controladora SCL-10Avp, misturador quaternário FCV-10ALvp, bomba LC-10ADvp, amostrador automático SIL 10-ADvp, detector ultravioleta SPD-10AVp e software CLASS VP 6.14. Foi utilizada uma coluna analítica C18 (250 x 4,6 mm; tamanho das partículas, 5 μm), marca Restek (Bellefonte, EUA). A fase móvel foi ácido acético/água ultrapura (6:94, v/v) em 2 mM de tampão de acetato sódio (solvente A, pH 2,55, v/v) e acetonitrila (solvente B). O programa de gradiente foi o seguinte: 0 % até 15 % de B em 45 min, 15 % até 30 % de B em 15 min, 30 % a 50 % de B em 5 min, e 50 % até 100 % de B em 5 min. O tempo de retorno à condição inicial foi de 10 min. A taxa de fluxo foi de 1,0 mL min^{-1} durante um tempo total de corrida de 80 min. O detector foi fixado em $\lambda=280$ nm e o volume de injeção de 20 μL para todas as amostras. Todos os padrões foram dissolvidos em metanol.

A identificação dos compostos fenólicos foi baseada nos tempos de retenção dos padrões: procianidina B1=10,9 min; catequina=17,4 min; procianidina B2=22,0 min; ácido clorogênico=22,7 min; epicatequina=35,2 min; quercetina 3-galactosídeo=52,6 min; e floridizina=67,0 min. A confirmação da identidade foi obtida pela adição de padrão interno nas amostras e comparação com a mesma amostra, sem a adição do padrão interno. A concentração do analito foi calculada conforme curvas de calibração derivadas do correspondente composto fenólico padrão puro, nas concentrações entre 0-100 mg g^{-1} . Todas as amostras foram preparadas e analisadas em duplicata.

Análise dos atributos de maturação dos frutos

Nas colheitas realizadas aos 134 e 138 DAPF em maçãs 'Brookfield[®]', e 165 e 172 DAPF em 'Mishima', foram utilizadas, adicionalmente, quatro repetições de 10 frutos, as

quais foram submetidos às análises de cor de fundo da casca, firmeza de polpa, índice de iodo-amido, sólidos solúveis (SS) e acidez titulável (AT).

A cor de fundo da casca foi determinada por um colorímetro eletrônico Konica Minolta[®], modelo CR400 (Tóquio, Japão). As leituras foram realizadas na região equatorial dos frutos e expressas em termos de ângulo *hue* (h°) (0° = vermelho; 90° = amarelo; 180° = verde e 270° = azul). A firmeza da polpa (Newton; N) foi determinada na região equatorial do fruto, em dois lados opostos, onde foi previamente removida uma pequena porção da casca, com o auxílio de um penetrômetro eletrônico (GÜSS Manufacturing Ltd., Cidade do Cabo, África do Sul), com ponteira de 11 mm de diâmetro. O índice de iodo-amido foi avaliado utilizando escala de 1 (secção transversal da polpa corada pelo complexo iodo-amido, indicando alto teor de amido e fruto imaturo) a 5 (secção transversal da polpa não corada pelo complexo iodo-amido, indicando teor de amido próximo a zero e fruto maduro). Os teores de SS e AT foram determinados por meio de uma amostra de 5mL de suco dos frutos, previamente extraído de fatias transversais retiradas da região equatorial das maçãs, com uma centrífuga elétrica marca Mondial, modelo 1260-01 (Conceição do Jacuípe, Brasil). A AT (% de ácido málico) foi determinada pela titulação de 5 mL de suco, diluído em 45 mL água destilada, com solução de hidróxido de sódio 0,1 N, até pH 8,1, usando-se titulador automático marca Schott Instruments, modelo TitroLine[®] easy (Mainz, Alemanha). O teor de SS (°Brix) foi medido usando refratômetro digital marca Atago[®], modelo PR201 α , com compensação automática de temperatura (Tóquio, Japão).

Análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições de 20 frutos por data de colheita, exceto para as análises de cor de fundo da casca,

firmeza de polpa, índice de iodo, SS e AT, onde foi utilizado quatro repetições de 10 frutos. Os dados de CFI, CFT, AAT foram submetidos à análise da variância (ANOVA), utilizando o programa estatístico SAS (SAS Institute, 2002). Os efeitos de data de colheita foram analisados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Análises de correlação de Pearson entre CFT e AAT (pelos métodos DPPH e ABTS), na casca e na polpa dos frutos, foram realizadas com o programa SAS.

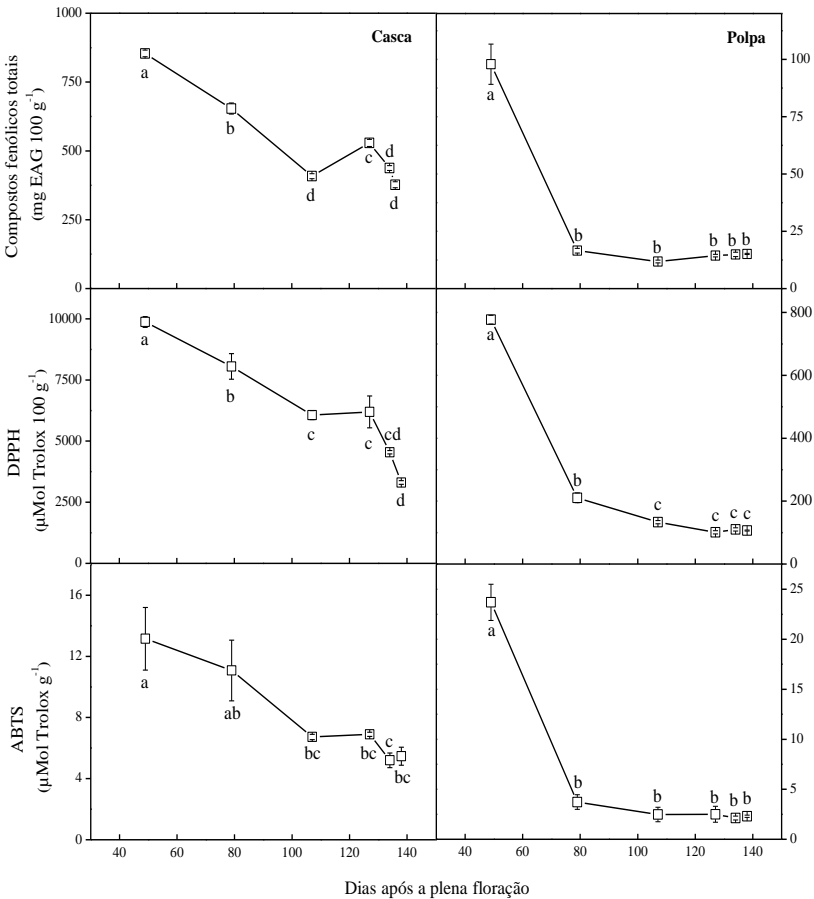
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises para caracterizar a maturação comercial, maçãs ‘Brookfield®’ apresentavam, respectivamente, aos 134 e 138 DAPF, h° da casca de 78,8 e 80,6; firmeza de polpa de 75,8 e 70,6 N; AT de 0,5% e 0,4%; SS de 10,8 e 10,7 °Brix; e índice de iodo-amido de 4,0 e 4,5. Maçãs ‘Mishima’ apresentavam, respectivamente, aos 165 e 172 DAPF, h° da casca de 83,8 e 85,3; AT de 0,5% e 0,4%; SS de 12,6 e 12,6 °Brix; e índice de iodo-amido de 3,5 e 3,8.

Com o avanço do desenvolvimento das maçãs ‘Brookfield®’, foi observado redução no CFT e na AAT (métodos ABTS e DPPH) na casca e polpa (Figura 1). Na casca, o CFT foi reduzido pela metade, comparando os frutos colhidos aos 49 DAPF com aqueles colhidos aos 134 e 138 DAPF. Nesse período, a AAT foi reduzida 3,0 e 2,5 vezes pelos métodos DPPH e ABTS, respectivamente. Os conteúdos de ácido clorogênico, floridizina, catequina e procianidina B1 foi maior aos 49 DAPF, diminuindo aos 79 DAPF e, partir de então, se mantiveram relativamente constantes até a maturação comercial (Tabela 1). Houve redução nos conteúdos de quercetina 3-galactosídeo, epicatequina e procianidina B2 a partir de 49 DAPF até 107 DAPF, com posterior incremento, atingindo aos 138 DAPF valores semelhantes aos quantificados aos 49 DAPF (Tabela 2). Na polpa, houve queda drástica no CFT e na AAT entre 49 e 79 DAPF e, a partir de 107 DAPF, se

mantiveram relativamente constantes. A redução foi de 6,5 no CFT, e de 7 e 10 vezes na AAT, quantificada, respectivamente, pelos métodos DPPH e ABTS. O valor de CFI foi maior aos 49 DAPF, caindo até 79 DAPF, permanecendo relativamente constantes a partir de então (Tabela 2).

Figura 1 - Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total determinada pelos métodos DPPH e ABTS, nos tecidos de casca e polpa, durante o desenvolvimento de maçãs ‘Brookfield®’. Letras diferentes no interior do gráfico, demonstram diferenças significativas entre épocas de análise dos frutos, determinadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão da média.



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 1 - Conteúdo de compostos fenólicos (mg kg⁻¹ MF), na casca e polpa, durante o desenvolvimento (dias após a plena floração - DAPF) de maçãs ‘Brookfield®’.

DAPF	AC	FL	QG	EP	CAT	P B1	P B2
Casca							
49	104,12 a	201,12 a	231,65 a	198,59 a	204,04 a	145,27 a	181,9 ab
79	38,77 b	58,79 b	173,71 ab	112,77 ab	14,61 b	37,31 b	121,00 b
107	26,00 b	14,25 c	114,2 b	73,68 b	8,31 b	22,95 b	81,51 b
127	32,16 b	12,38 c	155,06 ab	143,80 ab	10,08 b	30,84 b	192,71 ab
134	24,67 b	13,23 c	158,34 ab	129,84 ab	6,74 b	24,81 b	167,71 ab
138	42,13 b	33,18 bc	152,68 ab	183,03 a	9,14 b	36,22 b	302,47 a
C.V. (%)	21,08	23,74	19,02	25,26	51,23	33,90	32,09
Polpa							
49	106,50 a	72,33 a	ND ¹	11,94 a	15,40 a	25,37 a	ND
79	6,51 b	0,02 b	ND	0,19 b	0,57 b	0,96 b	ND
107	1,93 b	0,02 b	ND	0,11 b	0,45 b	0,37 b	ND
127	1,27 b	0,02 b	ND	0,06 b	0,21 b	0,48 b	ND
134	1,25 b	0,04 b	ND	0,08 b	0,29 b	0,44 b	ND
138	0,66 b	0,03 b	ND	ND	0,38 b	0,35 b	ND
C.V. (%)	68,77	64,19	-	141,72	110,82	121,58	-

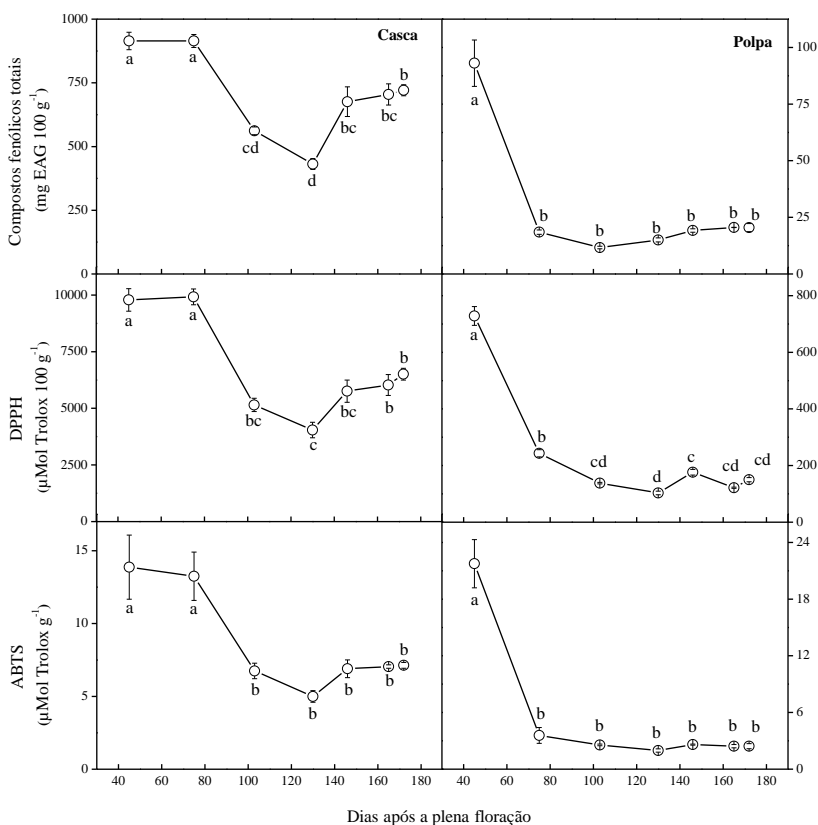
Fonte: produção do próprio autor, 2016. Valores seguidos da pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). AC=Ácido Clorogênico; FL=Floridizina; QG=Quercetina 3-Galactosídeo; EP=Epicatequina; CAT=Catequina; P=Procianidina.

¹Não detectado.

Na cultivar ‘Mishima’ também foi observada a redução no conteúdo de CFT e na AAT (ambos os métodos), com o avanço do desenvolvimento dos frutos (Figura 2). Na casca, comparando frutos colhidos aos 45 DAPF com aqueles colhidos aos 165 e 172 DAPF, foi observada redução de 1,3

vezes nos CFT, e 1,5 e 2,0 vezes na AAT quantificada pelos métodos DPPH e ABTS, respectivamente. Houve rápida redução no conteúdo de CFT e na AAT até 130 DAPF, seguido de incremento no conteúdo de CFT e na AAT quantificada pelo método DPPH. Houve redução de todos os compostos fenólicos avaliados, exceto a epicatequina e a procianidina B2, as quais apresentaram redução do conteúdo até 130 DAPF, seguido de incremento nas avaliações subsequentes, apresentando conteúdos semelhantes aos quantificados aos 45 DAPF (Tabela 2). A partir dos 145 DAPF houve um incremento no conteúdo de quercetina 3-galactosídeo (Tabela 2). Na polpa, o comportamento apresentado foi semelhante ao da cultivar Brookfield[®]. Houve queda drástica entre 45 e 75 DAPF, e manutenção a partir de 103 DAPF. As reduções observadas foram de 4,5 vezes para CFT, e de 5,0 e 9,0 vezes na AAT quantificada pelos métodos DPPH e ABTS, respectivamente. O conteúdo de todos os compostos fenólicos individuais foi maior na primeira data de colheita (45 DAPF) em relação às datas posteriores, permanecendo relativamente constantes de 75 até 172 DAPF (Tabelas 3).

Figura 2 - Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total determinada pelos métodos DPPH e ABTS, nos tecidos de casca e polpa, durante o desenvolvimento de maçãs 'Mishima'. Letras diferentes no interior do gráfico, demonstram diferenças significativas entre épocas de análise dos frutos, determinadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão da média.



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 2 - Conteúdo de compostos fenólicos (mg kg⁻¹ MF) durante o desenvolvimento (dias após a plena floração - DAPF) de maçãs 'Mishima'.

DAPF	AC	FL	QG	EP	CAT	P B1	P B2
Casca							
45	29,66 a	61,32 a	178,51 b	95,81 a	39,88 a	26,79 a	444,34 a
75	15,92 bc	38,04 b	252,59 ab	30,89 b	23,38 b	11,01bc	216,55 bc
103	4,117 c	13,72 c	161,59 b	5,67 b	4,59 c	3,49 c	57,89 c
130	4,67 bc	8,59 c	128,30 b	3,71 b	3,05 c	1,75 c	41,47 c
145	10,63 bc	20,06 c	264,93 ab	32,6 b	9,26 c	8,17 bc	184,69 bc
165	16,26 b	18,76 c	380,39 ab	25,90 b	9,29 c	9,34 bc	225,53 bc
172	15,87 bc	20,03 c	398,44 a	75,19 a	8,47 c	13,27 b	293,50 ab
C.V. (%)	30,80	21,30	25,25	34,61	26,22	30,31	24,89
Polpa							
45	160,73 a	21,00 a	ND ¹	30,73 a	39,42 a	362,80 a	ND
75	11,98 b	0,77 b	ND	0,57 b	0,10 b	0,53 b	ND
103	5,13 b	0,18 b	ND	0,26 b	0,18 b	0,26 b	ND
130	9,31 b	0,70 b	ND	0,62 b	0,35 b	0,11 b	ND
145	2,50 b	ND ²	ND	0,04 b	0,29 b	0,10 b	ND
165	3,83 b	ND	ND	0,39 b	0,26 b	0,08 b	ND
172	2,20 b	ND	ND	0,19 b	0,28 b	0,10 b	ND
C.V. (%)	21,88	57,64	-	79,02	52,72	118,33	-

Fonte: produção do próprio autor, 2016. Valores seguidos da pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). AC=Ácido Clorogênico; FL=Floridizina; QG=Quercetina 3-Galactosídeo; EP=Epicatequina; CAT=Catequina; P=Procianidina.

¹Não detectado.

Na maturação comercial, o conteúdo de CFI na polpa, de ambas as cultivares, representou, aproximadamente, 1% do quantificado 45 DAPF. A redução da AAT pode ser atribuída à

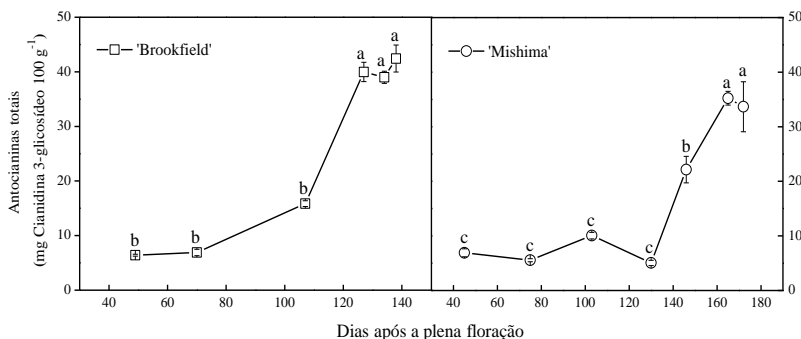
redução dos CFI, principalmente pela redução do conteúdo de catequina, epicatequina, procianidina B1 e de ácido clorogênico, por estes compostos serem os principais responsáveis pela AAT na polpa de maçãs (VOLZ; MCGHIE, 2011; CEYMANN et al., 2012; JAKOBEK et al., 2013). Comportamento similar nos valores de CFT, CFI e AAT reportado neste trabalho, foi observado por Zheng, Kim e Chung (2012) em maçãs ‘Fuji’, durante o desenvolvimento dos frutos (25-185 DAPF). Os autores atribuem à rápida redução de CFT à grande expansão celular que ocorre aproximadamente até 85 DAPF. Zhang, Li e Cheng (2010) sugerem que os compostos fenólicos são sintetizados e/ou acumulam-se a uma taxa mais lenta em relação ao crescimento dos frutos.

Na casca de maçãs ‘Brookfield®’, o incremento no conteúdo de procianidina B2, epicatequina e quercetina 3-galactosídeo não refletiu em aumento no conteúdo de CFT e na AAT na maturação comercial (134 e 138 DAPF). Em Maçãs ‘Mishima’, o incremento destes fenóis resultou em aumento do conteúdo de CFT e da AAT. O conteúdo de CFT é característico de cada cultivar (VOLZ; MCGHIE, 2011; CEYMANN et al., 2012; JAKOBEK et al., 2013; PANZELLA et al., 2013), e a contribuição dos diferentes grupos de compostos fenólicos apresenta variação sobre a AAT (TSAO et al., 2005; ZHENG; KIM; CHUNG, 2012). Os flavonoides são antioxidantes e/ou reguladores do desenvolvimento e desempenham importante função na fotoproteção (AGATI et al., 2013). Alonso-Salces et al. (2005) observaram em 12 cultivares de macieira incremento no conteúdo de quercetinas glicosiladas com o avanço da maturação. A quercetina glicosilada têm sido reportadas como um dos compostos fenólicos que mais contribuem para a AAT em maçãs, por apresentar vantagens estruturais em relação a outras moléculas (HYSON, 2011; AGATI et al., 2012; 2013), sendo um dos fenóis mais efetivos em todos os parâmetros antioxidativos (HYNSON, 2011). A quercetina glicosilada é o principal

flavonoide na casca de maçãs expostas ao sol, contribuindo positivamente na proteção contra a radiação UV-B (SOLOVCHENKO; SMICHTZ-EIBERGER, 2003). Portanto, a redução de flavonoides em magnitude menor na casca, em relação à polpa, constitui importante mecanismo de proteção contra radiação solar nos frutos, representando excelente fonte desses compostos para a dieta humana.

Em ambas as cultivares, o conteúdo de ANT aumentou com o avanço do desenvolvimento dos frutos (Figura 3). O incremento ocorreu nas duas 2 e 4 semanas antecedentes à maturação comercial, para ‘Brookfield®’ e ‘Mishima’, respectivamente. Bizjak et al. (2013 a,b) observaram resultados semelhantes em maçãs ‘Braeburn’. As antocianinas são a subclasse de flavonoides responsáveis pela produção da cor vermelha na casca de maçãs (BAE; KIM, 2006), atributo este importante para estimular o interesse de compra dos consumidores. Bi et al. (2014) afirmam que a cianidina 3-galactosídeo, principal antocianina presente na casca de maçãs, são mais efetivas na remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em relação a outros polifenóis. Os autores sugerem ainda que, em humanos, as antocianinas dos alimentos ficam em contato direto com o H_2O_2 no trato digestivo, atuando efetivamente na remoção desse composto.

Figura 3 - Mudanças na composição de antocianinas totais (mg cianidina 3-glicosídeo 100 g⁻¹ MF de casca), durante o desenvolvimento dos frutos de maçãs ‘Brookfield®’ e ‘Mishima’. Letras diferentes no interior do gráfico, demonstram diferenças significativas entre épocas de análise dos frutos, determinadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão da média.



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Os dados de CFI e ANT na casca sugerem que, nas 2 e 4 semanas que antecedem a maturação comercial para ‘Brookfield®’ e ‘Mishima’, respectivamente, a rota biossintética de produção dos flavonoides é intensificada, aumentando a concentração de quercetinas, nas formas glicosiladas, e de leucoantocianidinas (flavan-3,4-diol), que é precursor comum para flavan-3-óis e antocianidinas. Bizjak et al. (2013a) observaram comportamento semelhante na casca de maçãs ‘Braeburn’.

Foi observada correlação positiva e significativa ($p < 0,001$) entre conteúdo de CFT e a AAT (pelos métodos ABTS e DPPH) e entre os métodos de determinação da AAT, na casca e polpa de ambas as cultivares (Tabela 3). Os resultados obtidos neste trabalho confirmam os relatados por

Kevers et al. (2011), Zheng, Kim e Chung (2012) e Panzella et al. (2013), de que os CFT são os principais contribuintes da AAT em maçãs.

Tabela 3 - Coeficientes de correlação de Pearson entre compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante total (AAT), quantificada pelos métodos ABTS e DPPH, nas porções casca e polpa, em maçãs ‘Brookfield®’ e ‘Mishima’ durante o desenvolvimento.

Correlação	‘Brookfield®’		‘Mishima’	
	Casca	Polpa	Casca	Polpa
CFT x DPPH	0,92***	0,98***	0,94***	0,96***
CFT x ABTS	0,81***	0,99***	0,81***	0,98***
DPPH x ABTS	0,83***	0,98***	0,90***	0,97***

Fonte: produção do próprio autor, 2016. *** significativo a 0,001.

Diversos trabalhos mostram que o conteúdo de CFT e a AAT são maiores na casca do que na polpa de maçãs (VOLZ; MCGHIE et al., 2011; JAKOBEK et al., 2013). Além do maior conteúdo de CFT, compostos específicos são encontrados em maiores quantidades na casca, como a quercetina glicosilada, mostrando que a casca possui maior bioatividade em relação à polpa (PANZELLA et al., 2013; YANG et al., 2015). No entanto, com base no peso, a porcentagem de casca é muito inferior à de polpa, portanto a polpa pode representar a porção que mais contribui para o aporte de antioxidantes, principalmente, porque a casca tende a ser frequentemente descartada pelos consumidores.

2.6 CONCLUSÃO

O conteúdo de compostos fenólicos individuais e totais e a atividade antioxidante total de maçãs ‘Brookfield®’ e

‘Mishima’ diminui ao longo do desenvolvimento dos frutos. A redução na polpa ocorre em maior intensidade em relação à casca. Em ambas as cultivares, com o avanço do desenvolvimento, na casca, há um incremento no conteúdo de quercetina 3-galactosídeo, epicatequina e procianidina B2, coincidindo com o incremento no conteúdo de antocianinas totais. Em maçãs ‘Mishima’, este incremento reflete em aumento no conteúdo de CFT e na AAT.

3 CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM MAÇÃS ‘GALAXY’ ARMAZENADAS EM ATMOSFERA CONTROLADA DINÂMICA E ESTÁTICA

3.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do armazenamento em atmosfera controlada dinâmica, monitorada pelo quociente respiratório (ACD-QR) e pela fluorescência de clorofilas (ACD-FC), e em condições de atmosfera controlada estática (AC) sobre o conteúdo de compostos fenólicos individuais (CFI) e totais (CFT) e a atividade antioxidante total (AAT), nas porções da casca e polpa de maçãs ‘Galaxy’. Os tratamentos avaliados foram: ACD-QR (0,21 kPa O₂+1,2 kPa CO₂), ACD-FC (0,4 kPa O₂+1,2 kPa CO₂) e três condições de AC estática (1,2 kPa O₂ combinado com 1,2; 1,6; e 2,0 kPa CO₂) a 1,0±0,1 °C e UR de 94±1%. De maneira geral, o armazenamento em ACD-QR e ACD-FC proporcionaram maior retardo do amadurecimento dos frutos, seguido pela condição de AC estática com 2,0 kPa CO₂. O armazenamento em ACD-QR apresentou menor incidência de polpa farinácea, seguido dos tratamentos ACD-FC e AC estática com 1,6 e 2,0 kPa CO₂. A incidência de escurecimento da polpa foi menor em ACD-FC, em relação à ACD-QR e AC com 2,0 kPa de CO₂. A condição de AC estática com 1,2 kPa CO₂ apresentou

menor porcentagem de frutos sadios do que os demais tratamentos. Na casca não houve diferença no conteúdo de CFT, contudo, de maneira geral, o armazenamento ACD resultou em maior conteúdo de CFI, destacando-se a ACD-QR, com maior conteúdo de ácido clorogênico e procianidina B1. A AAT (método ABTS) foi maior em ACD-QR, diferindo apenas da AC estática com 1,2 kPa O₂ combinado com 1,6 ou 2, kPa CO₂. Na polpa, o conteúdo de CFT foi maior em ambos os sistemas de ACD, seguido da AC estática com 2,0 kPa CO₂. O armazenamento em ACD-QR resultou em maior conteúdo de CFI, não diferindo de ACD-FC. Em ACD-QR foi quantificado na polpa maior conteúdo de ácido clorogênico, epicatequina e catequina. Não houve efeito dos sistemas de armazenamanto sobre a AAT na polpa. A utilização da ACD, além de manter os atributos físico-químicos e de qualidade, resulta em frutos com maior conteúdo de CFT na polpa. A ACD-QR apresenta vantagens pelo maior conteúdo de CFI específicos com capacidade de promover a saúde dos consumidores.

Palavras-chave: *Malus domestica*. Fluorescência de clorofilas. Quociente respiratório. Cromatorafia líquida. Polifenóis.

PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF 'GALAXY' APPLES STORED IN DYNAMIC AND STATIC CONTROLLED ATMOSPHERE

3.2 ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of storage in dynamic controlled atmosphere, monitored by respiratory quotient (DCA-RQ) and the chlorophyll fluorescence (DCA-CF), and static controlled atmosphere (CA) about the content of individual phenolics compounds (IFC) and total (TFC) and the total antioxidant activity (TAA), the portions of the peel

and pulp of apples 'Galaxy'. The treatments were: DCA-QR (0,21 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂), DCA-CF (0,4 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂) and three static CA conditions (1,2 kPa O₂ combined with 1,2; 1,6 and 2,0 kPa CO₂) to 1,0 ± 0,1 ° C and RH 94 ± 1%. Generally, the DCA-QR and DCA-CF storage provided greater delay the ripening of the fruit, followed by static CA condition with 2,0 kPa CO₂. The DCA-RQ storage showed a lower incidence of mealiness, followed by DCA-CF treatment and static CA with 1,6 and 2,0 kPa CO₂. The incidence of browning was lower in DCA-CF compared to the DCA-RQ and CA with 2,0 kPa CO₂. Static CA condition with 1,2 kPa CO₂ showed a lower percentage of healthy fruits than the other treatments. In the peel there was no difference in the content of TFC, however, generally, the DCA storage resulted in higher content of IFC, especially the DCA-RQ with higher content of chlorogenic acid and procyanidin B1. TAA (ABTS assay) was increased in DCA-RQ, differing only static AC 1,2 kPa O₂ combined with 1,6 or 2,0 kPa CO₂. In the pulp, the TFC content was higher in both DCA systems, followed by static CA with 2,0 kPa CO₂. The DCA-RQ storage resulted in higher IFC content, not differing from DCA-CF. In DCA-RQ was quantified in the pulp higher content of chlorogenic acid, epicatechin and catechin. No effects of storage systems on the TAA in the pulp. The use of the DCA, in addition to maintaining the physical and chemical attributes and quality, results in fruit with higher content of TFC in the pulp. The DCA-RQ has advantages by higher content specific IFC with capacity to promote the health of consumers.

Keywords: *Malus domestica*. Chlorophyll fluorescence. Respiratory quotient. Liquid chromatography. Polyphenols.

3.3 INTRODUÇÃO

O consumo regular de maçãs tem sido frequentemente associado à potencialização dos efeitos promotores da saúde humana através da prevenção de doenças crônicas (HYSON, 2011; LI et al., 2012; CONDEZO-HOYOS; MOHANTY; NORATTO, 2014). Compostos bioativos de maçãs tem demonstrado efeito antimicrobiano (ROUNDS, et al., 2012; FRIEDMAN; HENIKA; LEVIN, 2013; ROUNDS, et al., 2013), anti-inflamatório (ANDRE et al., 2012; DENIS et al., 2013), prevenção do câncer (JEDRYCHOWSKI et al., 2010; SERRA, et al., 2010), prevenção de doenças cardiovasculares (RAPASINGHE; WANG; THILAKARATHNA, 2011; CHAI et al., 2012), osteoporose (HOOSHMAND et al., 2011) e redução de triglicerídeos (YAO et al., 2014). Estes efeitos benéficos têm sido atribuídos ao conteúdo de compostos fenólicos e sua capacidade antioxidante (PANZELLA et al., 2013).

Os principais grupos de compostos fenólicos em maçãs são os ácidos hidroxicinâmicos, dihidrochalconas, flavonóis, flavan-3-óis, nas formas monoméricas ((+)-catequina e (-)-epicatequina) e oligomérica (proantocianidinas), e antocianinas (CEYMANN et. al., 2012; JAKOBEK et al., 2013). A ocorrência e o conteúdo destes compostos variam entre cultivares (JAKOBEK et al., 2013; PANZELLA et al., 2013), tecido da casca e da polpa (VOLZ; McGHIE, 2011; JAKOBEK et al., 2013), manejo do pomar (PETKOVSEK et al., 2010), e condições de armazenamento (CARBONE et al, 2011; HOANG; GOLDING; WILKES, 2011; KEVERS et al., 2011).

No Brasil, a malicultura concentra-se nas cultivares Gala e Fuji e seus clones coloridos. As maçãs do grupo ‘Gala’ correspondem a 58% do total produzido (WAPA, 2011), com período de colheita de janeiro a março. Com intuito de prolongar a oferta e atender ao mercado consumidor, diversos métodos têm sido propostos para ampliar a conservação pós-colheita de maçãs. O armazenamento de maçãs em atmosfera

controlada (AC) estática, com baixo O₂ (0,8 a 1,2 kPa) e alto CO₂ (2,0 a 3,0 kPa), é a principal tecnologia complementar à refrigeração atualmente usada para a conservação pós-colheita de maçãs (BRACKMANN et al., 2010). A AC estática reduz o metabolismo dos frutos, conserva atributos físico-químicos e reduz e/ou inibe a ocorrência de distúrbios fisiológicos (GWANPUA et al., 2012; BOTH et al., 2014a). Em AC estática, o aumento dos níveis de CO₂ demonstrou ser benéfico na redução do metabolismo e manutenção da qualidade dos frutos. Para as maçãs do grupo ‘Gala’, o nível de CO₂ recomendado é entre 2,0 e 3,0 kPa (BRACKMANN et al., 2001).

A atmosfera controlada dinâmica (ACD) tem sido proposta como um sistema de armazenamento que pode ser mais eficiente do que a AC estática (THEWES et al., 2015). Na ACD o limite inferior de O₂ é adaptado de forma dinâmica, em função do tempo de armazenamento, com base na medida de uma resposta biológica do fruto armazenado para baixos níveis de oxigênio (ZANELLA, 2003). A ACD-FC (WRIGHT et al., 2010; WRIGHT et al., 2012) e a ACD-QR (BESSEMANS et al., 2016), são metodologias propostas para detectar o limite de baixo oxigênio tolerado pelos frutos. Em relação à AC estática, o armazenamento ACD-FC demonstrou reduzir a taxa de produção de etileno, a perda de firmeza de polpa e o escurecimento interno de maçãs ‘Royal Gala’ e ‘Galaxy’ (THEWES et al., 2015). Em maçãs ‘Granny Smith’, a ACD-QR reduziu a perda de firmeza de polpa e a incidência de escaldadura superficial, em relação à AC estática (BESSEMANS et al., 2016). Brackmann, Weber e Both (2015) afirmam que o armazenamento de maçãs ‘Galaxy’ em ACD-QR, resulta em frutos com melhor qualidade em relação a ACD-FC. Em AC estática, estes autores afirmam que o armazenamento com 2,0 kPa de CO₂ é mais apropriado para a manutenção da qualidade desta cultivar, em relação ao armazenamento com níveis inferiores de CO₂.

Na literatura brasileira não existem trabalhos sobre o conteúdo de compostos fenólicos, bem como sobre a AAT de maçãs, submetidas a diferentes sistemas de armazenamento. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ACD monitorada pelo quociente respiratório e por fluorescência de clorofilas e de três condições de AC estática (1,2 kPa de O₂ + 1,2; 1,6; e 2,0 kPa de CO₂) sobre o conteúdo de CFI e CFT e sobre a AAT nas porções da casca e polpa, bem como sobre a manutenção da qualidade de maçãs ‘Galaxy’ armazenadas por nove meses e mais sete dias de prateleira.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e aplicação dos tratamentos

Maçãs ‘Galaxy’ foram colhidas em um pomar comercial em Vacaria, RS (28°30'44"S de latitude, 50°56'02"W de longitude e 970 m de altitude), na safra 2012/2013. Após a colheita, os frutos foram transportados para o laboratório, onde foi realizada a seleção dos frutos e a homogeneização das amostras experimentais. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 frutos. Os tratamentos testados foram: armazenamento em ACD-QR= 1,5 (0,21 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂); ACD-FC (0,4 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂); AC estática com 1,2 kPa O₂ e três pressões parciais de CO₂: 1,2; 1,6; e 2,0 kPa. Os frutos foram mantidos a temperatura de 1,0±0,1 °C e umidade relativa de 94±1% durante nove meses e avaliados após sete dias de exposição dos frutos em condições ambiente (20±1 °C e UR de 65±5%), simulando o período de comercialização.

Controle e manutenção da atmosfera de armazenamento

Para obtenção das condições atmosféricas desejadas, foram utilizadas câmaras experimentais de 0,23 m³, onde foi feita a injeção de nitrogênio até atingir o nível de oxigênio de pré-estabelecido. Na AC estática, o nível de dióxido de

carbono foi obtido pelo acúmulo do gás na câmara de armazenamento devido à respiração dos frutos. Durante o tempo de armazenamento, os níveis de dióxido de carbono e oxigênio foram determinados e corrigidos diariamente com o auxílio de um sistema automático de controle de AC. O equipamento comparou os níveis de oxigênio e dióxido de carbono a um ponto de ajuste (*set point*). Quando o nível de oxigênio era inferior ao ponto de ajuste, O₂ foi injetado até a concentração desejada. O mesmo foi utilizado para a correção do dióxido de carbono. Quando o nível de CO₂ era superior à concentração desejada, o excesso foi absorvido automaticamente com um purificador de cal.

Na ACD-FC a pressão parcial de oxigênio foi monitorada e corrigida de acordo a metodologia proposta por Prange et al. (2007), utilizando um sistema HarvestWatch™. O pico de fluorescência foi detectado em 0,06 kPa O₂ e, posteriormente, o oxigênio foi injetado e mantido entre 0,35 e 0,45 kPa até a ocorrência de novo pico de fluorescência de clorofilas.

Na ACD-QR, o QR foi inicialmente calculado a cada dois dias e depois a cada cinco dias pela relação entre a produção CO₂ e o consumo de O₂. De acordo com resultados do QR calculado, a pressão parcial de O₂ foi ajustada (aumentada ou diminuída) para que o RQ permanecesse próximo de 1,5, durante todo o período de armazenamento. Foi utilizado QR de 1,5, pois os estudos realizados até então, avaliando os níveis de QR sobre a manutenção da qualidade de maçãs ‘Gala’, demonstraram ser o mais adequado para maçãs do grupo ‘Gala’ (informação pessoal)¹.

Avaliação da qualidade dos frutos.

Após nove meses de armazenamento e mais sete dias de prateleira foram realizadas as análises das taxas respiratória e

¹Notícia fornecida por Auri Brackmann, 2013.

de produção de etileno, firmeza de polpa, acidez titulável e sólidos solúveis utilizando a metodologia descrita por Thewes et al. (2015).

O escurecimento de polpa foi obtido pela contagem de frutos que apresentavam sinais de escurecimento interno. A incidência de polpa farinácea foi determinada pela quantificação dos frutos que apresentaram sintomas do distúrbio (polpa seca, sem suculência e aspecto farináceo). Os frutos sadios foram quantificados através da contagem de frutos que não apresentavam incidência de podridões, rachaduras, escurecimento de polpa e polpa farinácea. Os resultados dos distúrbios e de frutos sadios foram expressos em porcentagem.

Reagentes, padrões e solventes

Os reagentes 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), Folin-Ciocalteu, acetato de sódio e persulfato de potássio foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), com grau analítico (PA). Os padrões de ácido clorogênico, catequina, epicatequina, procianidina B1, procianidina B2, quercetina 3-galactosídeo e floridizina, e os solventes acetonitrila, ácido acético e metanol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), todos com grau de pureza HPLC. Ácido gálico, carbonato de sódio, acetona e álcool etílico foram obtidos da Vetec[®] (Rio de Janeiro, Brasil), com grau analítico (PA).

Preparação das amostras

Após nove meses de armazenamento e mais sete dias de prateleira, a casca de toda superfície distal do fruto foi removida com uma lâmina cortante (1 mm de espessura). A amostra de polpa foi retirada por meio de uma fatia longitudinal, de cerca de um centímetro, da porção mediana da

região distal, descartando a região do endocarpo e conservando cada lado da fatia. Imediatamente após, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer, marca Thermo Scientific, modelo 900 Series (Ohio, Estados Unidos). As amostras de polpa foram processadas com triturador vertical, marca Philips Walita, modelo RI1364 (Varginha, Brasil) e as amostras de casca foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido.

Obtenção dos extratos para quantificação de CFT e AAT

A obtenção do extrato para a quantificação de CFT e AAT foi realizada conforme descrito por Rufino et al. (2007), adaptado de Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997). Foram utilizadas 20 g de polpa e 5 g de casca. A amostra foi colocada em um tubo Falcon (Zollstr, Suíça) adicionando-se 20 mL de metanol/água destilada (50:50, v/v), com posterior homogeneização em ultraturrax, marca Heidolph, modelo D-91126 (Schwabach, Alemanha) e repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Após, as amostras foram centrifugadas a 12.880 g por 20 minutos a 4°C, em uma centrífuga Eppendorf, modelo 5810R (Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e ao resíduo da primeira extração, foram adicionados 20 mL de acetona/água destilada (70:30, v/v), com posterior homogeneização e repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram submetidas à nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi transferido para o balão volumétrico contendo o primeiro sobrenadante e o volume foi completado para 50 mL com água destilada.

Determinação do conteúdo de CFT na casca e na polpa

O conteúdo de CFT foi determinado usando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu modificado, descrito por Roesler et al. (2007). Foi adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu/água destilada (25:75, v/v) à 0,5 mL de uma

diluição conhecida do extrato hidroalcolóico, em triplicata, em um tubo de ensaio, seguido de homogeneização em agitador de tubos, marca Arsec, modelo ATS-100 (São Paulo, Brasil), e manutenção durante 3 min à 20 °C para a reação. Em seguida, foi adicionado 2,0 mL de solução de carbonato de sódio (10 g 100 mL⁻¹), e as amostras novamente agitadas e mantida em repouso durante 1 hora ao abrigo da luz. A absorbância foi determinada no comprimento de onda (λ) de 765 nanômetros (nm), em espectrofotômetro UV-visível, marca Bel Photonics, modelo BEL2000-UV (Piracicaba, Brasil). O conteúdo de CFT foi calculado a partir da curva de calibração, preparada com ácido gálico e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes ácido gálico por 100 g de massa fresca (mg EAG 100 g⁻¹ MF).

Determinação da AAT na casca e na polpa

A AAT foi determinada utilizando as metodologias baseadas na capacidade do extrato de sequestrar os radicais 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (método ABTS) (RUFINO et al., 2007) e 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (método DPPH) (BRAND-WILLIANS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Para o método ABTS, o radical foi gerado a partir da reação da solução estoque de ABTS (7 mM) com o persulfato de potássio (140 mM), mantido no escuro por 16 h, à 20 °C. Antes da análise, o radical foi diluído com álcool etílico até obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$, no $\lambda=734$ nm. O radical ABTS foi diluído em etanol até obter-se uma medida de absorbância de $0,70 (\pm 0,05)$ no $\lambda=734$ nm. A partir do extrato hidroalcolóico, foram preparadas, em tubos de ensaio, três diluições diferentes, em triplicata. Foram transferidas alíquotas de 30 μ L de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS, e homogeneizadas em agitador de tubos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível, marca Bel Photonics, modelo BEL2000-UV

(Piracicaba, Brasil), no $\lambda=734$ nm, após 6 min de reação. Foi utilizado álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. A partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, foi obtida a equação da reta. Curvas com soluções padrões de Trolox foram construídas e os resultados de AAT foram expressos em equivalente de Trolox (TEAC) por g de massa fresca ($\mu\text{Mol TEAC g}^{-1}\text{MF}$).

Para o método DPPH, o radical (0,06 mM) foi preparado no dia da avaliação, diluído em metanol. Foi transferida uma alíquota de 0,1 mL do extrato hidroalcoólico para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH, em triplicata, com posterior homogeneização em agitador de tubos. A medida de absorvância foi realizada no $\lambda=515$ nm, após 30 min de reação com adição da amostra. Foi utilizado álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. Curvas com soluções padrões de Trolox foram construídas, e os resultados de AAT foram expressos em $\mu\text{Mol TEAC } 100\text{ g}^{-1}\text{MF}$.

Determinação de CFI na casca e polpa

As análises de CFI foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito por Tsao et al. (2003). A preparação das amostras foi a mesma utilizada para CFT e AAT. Cada amostra foi transferida para um becker com metanol/água ultrapura (70:30, v/v), na proporção de 1:1 (p/v), onde foram homogeneizadas usando um ultraturrax marca Heidolph, modelo D-91126 (Schwabach, Alemanha). A filtragem foi realizada por filtro quantitativo sob vácuo e, em seguida, por um filtro de seringa de 0,45 μm , marca Kasvi (Curitiba, Brasil). A amostra final permaneceu armazenada a -50 °C até a análise.

A quantificação de CFI foi realizada através de CLAE, com um cromatógrafo da marca Shimadzu (Tóquio, Japão), equipado com controladora SCL-10Avp, misturador quaternário FCV-10ALvp, bomba LC-10ADvp, amostrador

automático SIL 10-ADvp, detector ultravioleta SPD-10AVp e software CLASS VP 6.14. Foi utilizada uma coluna analítica C18 (250 x 4,6 mm; tamanho das partículas, 5 μm), marca Restek (Bellefonte, EUA). A fase móvel foi ácido acético/água ultrapura (6:94, v/v) em 2 mM de tampão de acetato sódio (solvente A, pH 2,55, v/v) e acetonitrila (solvente B). O programa de gradiente foi o seguinte: 0 % até 15 % de B em 45 min, 15 % até 30 % de B em 15 min, 30 % a 50 % de B em 5 min, e 50 % até 100 % de B em 5 min. O tempo de retorno à condição inicial foi de 10 min. A taxa de fluxo foi de 1,0 mL min^{-1} durante um tempo total de corrida de 80 min. O detector foi fixado em $\lambda=280$ nm e o volume de injeção de 20 μL para todas as amostras. Todos os padrões foram dissolvidos em metanol.

A identificação dos compostos fenólicos foi baseada nos tempos de retenção dos padrões: procianidina B1=10,9 min; catequina=17,4 min; procianidina B2=22,0 min; ácido clorogênico=22,7 min; epicatequina=35,2 min; quercetina 3-galactosídeo=52,6 min; e floridizina=67,0 min. A confirmação da identidade foi obtida pela adição de padrão interno nas amostras e comparação com a mesma amostra, sem a adição do padrão interno. A concentração do analito foi calculada conforme curvas de calibração derivadas do correspondente composto fenólico padrão puro, nas concentrações entre 0-100 mg g^{-1} . Todas as amostras foram preparadas e analisadas em duplicata.

Análise estatística

Os valores em % foram previamente transformados pela fórmula arco seno $[(x+0,5)/100]^{1/2}$. Os dados de AAT, CFT e CFI (de casca e polpa), taxas respiratória e de produção de etileno, firmeza de polpa, acidez titulável, sólidos solúveis, distúrbios fisiológicos (escurecimento da polpa e polpa farinácea) e frutos sadios foram submetidos à análise da variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram

comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Foi realizada análise de correlação de Pearson entre as variáveis CFT e a soma de CFI, na casca e na polpa, e entre a soma de CFI e a AAT pelo método ABTS na casca dos frutos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS (SAS Institute, 2002).

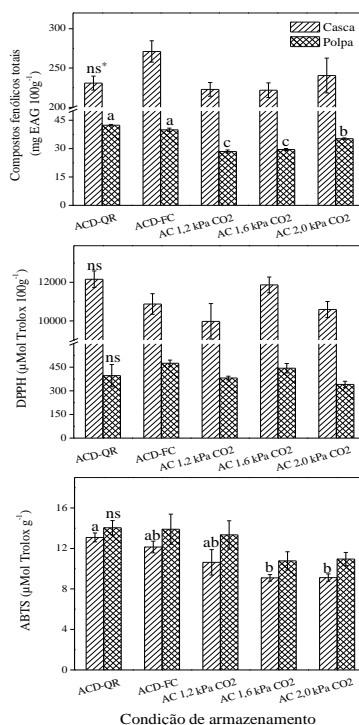
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto a ACD-QR quanto a ACD-FC e a AC com 2,0 kPa de CO_2 proporcionaram frutos com menor taxa respiratória do que os frutos armazenados em AC com 1,2 e 1,6 kPa de CO_2 . Frutos armazenados em ACD, independente do indicador de resposta biológica do fruto ao baixo oxigênio utilizado, apresentaram menor taxa de produção de etileno. A firmeza de polpa foi maior em ACD-QR, não diferindo de ACD-FC. A AT foi maior em AC com 2,0 kPa de CO_2 , não diferindo de ambas as condições de ACD. Não houve diferença no teor de SS em função das condições de armazenamento (dados não apresentados). Outros trabalhos também verificaram menores taxas respiratória e de produção de etileno (THEWES et al., 2015) e melhor manutenção da firmeza de polpa (BRACKMANN; WEBER; BOTH, 2015; THEWES et al., 2015; BESSEMANS et al., 2016) em maçãs armazenadas em ACD.

Na casca, o conteúdo de CFT não diferiu entre os sistemas de armazenamento (Figura 4). Porém, a soma de compostos fenólicos individuais foi maior em ACD-QR, diferindo apenas da condição de AC com 1,6 kPa de CO_2 (Tabela 4). De maneira geral, na casca, os maiores conteúdos de CFI foram quantificados em ACD, destacando-se a ACD-QR, com maior conteúdo de ácido clorogênico e procianidina B1 (Tabela 1). O maior conteúdo de CFI em ACD-QR, não refletiu em aumento no conteúdo de CFT nesta condição, o que pode estar relacionado a baixa correlação,

embora significativa, entre CFT e a soma de CFI ($r=0,52$; $p=0,05$). Este efeito pode ser atribuído à interação do reagente Folin-Ciocalteu com compostos não fenólicos e resultar em um conteúdo de CFT superestimado (NACZK; SHAHIDI, 2004; GEORGÉ et al., 2005). A AAT quantificada pelo método DPPH, não diferiu entre os sistemas de armazenamento. Todavia, a AAT quantificada pelo método ABTS foi maior em ACD-QR, diferindo das condições de AC com 2,0 e 1,6 kPa de CO₂ (Figura 4). A maior AAT quantificada em ACD-QR pelo método ABTS pode ser atribuída à correlação positiva e significativa entre este método e a soma de CFI ($r=0,66$; $p=0,01$). Floegel et al. (2011) afirmam que, para a quantificação da AAT na casca, o método ABTS é considerado de maior precisão em relação ao método DPPH, pois reflete melhor a atividade antioxidante em alimentos ricos em compostos hidrossolúveis, lipossolúveis e em pigmentação. Na condição de 2,0 kPa de CO₂, a soma de CFI quantificada foi numericamente maior em relação a 1,2 kPa de CO₂, no entanto, a maior soma de CFI não refletiu em aumento na AAT quantificada pelo método ABTS. Este resultado pode ser atribuído aos efeitos sinérgicos e aditivos que os diferentes compostos fenólicos apresentam sobre a AAT (BOLLING; CHEN; CHEN, 2013; REBER; EGGETT; PARKER, 2011; WANG et al., 2011). A condição de 1,2 kPa de CO₂ apresentou maior conteúdo de quercetina 3-galactosídeo, composto este, apontado como um dos que mais contribuem para a AAT em maçãs, por apresentar vantagens estruturais em relação a outras moléculas (AGATI et al., 2012; 2013; HYSON, 2011), o que pode ter refletido no aumento da AAT pelo método ABTS nesta condição.

Figura 4 - Conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total (métodos DPPH e ABTS), nos tecidos de casca e polpa, em maçãs ‘Galaxy’ armazenadas por nove meses em diferentes condições de armazenamento, seguidos por mais sete dias de exposição em condições ambiente (20 ± 1 °C e UR de $65\pm 5\%$). ACD-QR= 1,5 (0,21 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂); ACD-FC: ACD por fluorescência de clorofilas (0,4 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂); AC (1,2 kPa O₂ + 1,2; 1,6; e 2,0 kPa CO₂).



ACD-QR=atmosfera controlada dinâmica por quociente respiratório. AC=atmosfera controlada estática. Letras minúsculas diferentes no interior do gráfico indicam diferenças estatísticas significativas entre médias de tratamentos em cada tecido (casca e polpa) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ns: não significativo ($p > 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão da média. Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 4 - Conteúdo de compostos fenólicos (mg kg⁻¹ MF) em maçãs ‘Galaxy’ armazenadas por nove meses em atmosfera controlada dinâmica (ACD) e atmosfera controlada estática (AC) e seguidos por mais sete dias de exposição em condições ambiente (20±1 °C e UR de 65±5%). (Continua)

Condição de armazenamento	AC	FL	QG	EP
	Casca			
ACD-QR ¹	34,92 a*	22,88 a	168,42 ^{ns}	87,25 ab
ACD-FC ²	19,66 b	17,47 ab	175,74	107,89 ab
AC (1,2 kPa CO ₂) ³	11,85 c	11,47 bc	190,42	21,01 bc
AC (1,6 kPa CO ₂) ⁴	11,58 c	10,07 c	180,98	3,65 c
AC (2,0 kPa CO ₂) ⁵	15,29 cb	15,57 bc	177,66	59,96 abc
C.V. (%)	15,07	15,08	18,37	52,25
	Polpa			
ACD-QR ¹	22,42 a	0,29 ^{ns}	ND	3,05 a
ACD-FC ²	17,53 ab	0,22	ND	ND
AC (1,2 kPa CO ₂) ³	7,44 c	0,09	ND	0,12 b
AC (1,6 kPa CO ₂) ⁴	9,56 bc	0,22	ND	0,16 b
AC (2,0 kPa CO ₂) ⁵	13,06 bc	0,36	ND	0,74 b
C.V. (%)	23,21	45,77	-	36,84
Condição de armazenamento	CAT	P B1	P B2	Soma
	Casca			
ACD-QR ¹	ND	45,25 a	168,13 a	526,84 a
ACD-FC ²	0,47 b	21,36 b	143,70 a	486,28 ab
AC (1,2 kPa CO ₂) ³	2,93 a	17,92 b	116,93 ab	372,54 ab
AC (1,6 kPa CO ₂) ⁴	1,29 b	19,69 b	84,65 b	311,88 b
AC (2,0 kPa CO ₂) ⁵	1,09 b	15,73 b	114,43 a	399,72 ab
C.V. (%)	27,36	16,14	17,37	16,70

Tabela 4 - Conteúdo de compostos fenólicos (mg kg⁻¹ MF) em maçãs ‘Galaxy’ armazenadas por nove meses em atmosfera controlada dinâmica (ACD) e atmosfera controlada estática (AC) e seguidos por mais sete dias de exposição em condições ambiente (20±1 °C e UR de 65±5%). (Conclusão)

Condição de armazenamento	CAT	P B1	P B2	Soma
	Polpa			
ACD-QR ¹	1,22 a	0,57 ab	ND	27,56 a
ACD-FC ²	0,78 ab	0,46 b	ND	18,99 ab
AC (1,2 kPa CO ₂) ³	0,20 b	0,50 b	ND	8,35 c
AC (1,6 kPa CO ₂) ⁴	0,20 b	0,35 b	ND	10,48 bc
AC (2,0 kPa CO ₂) ⁵	0,56 b	1,05 a	ND	15,77 bc
C.V. (%)	39,76	33,98	-	22,95

Fonte: Produção do próprio autor, 2016. *Médias não seguidas pela mesma letra nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). AC=Ácido Clorogênico; FL=Floridizina; QG=Quercetina 3-Galactosídeo; EP=Epicatequina; CAT=Catequina; P=Procianidina. ns: não significativo (p>0,05); ND: não detectado.

¹QR: quociente respiratório = 1,5 (0,21 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂)

²FC: fluorescência de clorofilas (0,4 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂)

³AC: 1,2 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂

⁴AC: 1,2 kPa O₂ + 1,6 kPa CO₂

⁵AC: 1,2 kPa O₂ + 2,0 kPa CO₂

Na polpa, o conteúdo de CFT foi maior em ambas as condições de ACD, seguido pela AC com 2,0 kPa de CO₂ (Figura 4). A ACD-QR apresentou maior soma de fenóis individuais, não diferindo de ACD-FC (Tabela 4). De maneira geral, ACD-QR apresentou maior conteúdo de ácido clorogênico, epicatequina e catequina em relação as demais condições de armazenamento (Tabela 4). Houve correlação positiva e significativa entre CFT e a soma de CFI (r=0,85; p<0,001), indicando que os compostos fenólicos individuais quantificados são os principais contribuintes para o conteúdo

de CFT. Não houve efeito dos sistemas de armazenamanto sobre a AAT por ambos os métodos de quantificação (Figura 4). A ausência de resultados claros na AAT na polpa dos frutos pode ser atribuída ao fato de que, em amostras complexas como nos frutos, a AAT é resultado da presença de várias moléculas e seus efeitos sinérgicos, portanto a AAT não pode ser relacionada com uma única classe de compostos, devido ao efeitos sinérgicos e aditivos que apresentam (WANG et al., 2011; REBER; EGGETT; PARKER, 2011; BOLLING; CHEN; CHEN, 2013). Embora vários métodos tenham sido desenvolvidos nos últimos anos para avaliação da AAT, nenhum deles é capaz de medir a capacidade antioxidante com precisão (KEVERS et al., 2011).

O conteúdo de todos os CFI avaliados foi superior na casca, resultando em um conteúdo de CFT sete vezes maior em relação à polpa. É fato consolidado pela literatura a maior concentração de compostos fenólicos na casca em relação a polpa de maçãs (CARBONE et al., 2011; VOLZ; McGHIE, 2011; JAKOBEK et al., 2013). Além do maior conteúdo, a presença de compostos específicos, como as quercetinas glicosiladas, sugerem que a casca possui maior bioatividade em relação à polpa de maçãs (PANZELLA et al., 2013; YANG et al., 2015). No entanto, considerando que uma maçã com massa de 126 g, possui 96,5 g de porção comestível e desta porção, 6,5 g corresponde à casca, esta relação resulta em, aproximadamente, 14 vezes a massa de polpa em relação à casca. Portanto, a polpa corresponde a porção que mais contribui no consumo de compostos fenólicos e antioxidantes, devido a porcentagem de casca dos frutos ser muito inferior à de polpa.

Plaza, Kariuki e Turner (2014) afirmam que os ácidos fenólicos e os flavonóis são os principais responsáveis pela capacidade antioxidante total de extratos de maçã, com destaque para o ácido clorogênico, um ácido fenólico não identificado, a quercetina 3-galacosídeo e um de seus

derivados, os quais apresentam as maiores capacidades antioxidantes. Diversos trabalhos *in vivo* e *in vitro* relatam possíveis benefícios do consumo de compostos específicos presentes na maçã. O ácido clorogênico é o principal ácido fenólico presente na maçã e apresenta grande capacidade de eliminar radicais livres (PANZELLA et al., 2013). O seu consumo está associado à prevenção de doenças cardiovasculares (BONITA et al., 2007), redução do risco de diabetes tipo II (BIDEL; HU; TUOMILEHTO, 2008) e ação anti-inflamatória (MARTINEZ-MICAELO et al., 2015). A procianidina B1 demonstrou efeito anti-diabetes (YAMASHITA et al., 2013) e anti-Alzheimer (KANNO et al., 2015). A epicatequina foi responsável pela melhoria nas funções cardiovasculares (SCHROETER et al., 2010), demonstrou ação anti-inflamatória (RUIJTERS et al., 2014) e benefícios sobre alterações renais associadas à doenças inflamatórias ou metabólicas (PRINCE et al., 2016). Já a catequina demonstrou ação anti-inflamatória (CHEN et al., 2011) e anti-obesidade (JIN et al., 2013). Serra et al. (2012), avaliando o efeito protetor cardiovascular do consumo de diferentes cultivares de maçã e a correlação com a composição química, afirmam que catequina, epicatequina, procianidina B1 e o β -caroteno são os principais compostos responsáveis pela redução do colesterol. Portanto, o armazenamento de maçãs em ACD pode contribuir para uma dieta com maior conteúdo de compostos bioativos, refletindo em benefícios na saúde dos consumidores.

Frutos armazenados em ACD-FC apresentaram menor incidência de escurecimento da polpa do que os frutos armazenados em ACD-QR e AC com 2,0 kPa CO₂, porém, não diferindo de AC com 1,6 e 1,2 kPa CO₂ (Tabela 5). Singh e Singh (2013) e Yan et al. (2013) atribuem o escurecimento dos tecidos à perda da integridade da membrana pela oxidação enzimática de compostos fenólicos pela polifenoloxidase (PPO), resultando na redução do conteúdo de compostos

fenólicos. Parâmetros cinéticos indicaram que o ácido clorogênico é o melhor substrato para a enzima PPO, no entanto, pode ocorrer uma interação química entre ácido clorogênico, catequina e epicatequina (AMAKI et al., 2011). Surpreendentemente, estes compostos fenólicos apresentaram maior conteúdo na condição de ACD-QR, o que pode ter sido resultado da intensificação do metabolismo secundário devido à condição de estresse provocada pela pressão parcial de oxigênio muito baixa (aproximadamente 0,2 kPa). Ho et al. (2013) afirmaram que a incidência de escurecimento aumenta devido à baixa produção de energia pelo armazenamento de frutos sob baixos níveis de oxigênio. Reduzidas pressões parciais de O₂ na câmara do armazenamento podem limitar a difusão de oxigênio para as células do interior da polpa dos frutos, induzindo a respiração anaeróbica e a formação de compostos como etanol e acetaldeído, os quais, podem induzir o colapso das células (HO et al., 2010; DEUCHANDE et al., 2012). A alta incidência de escurecimento da polpa em maçãs armazenadas em AC com 2 kPa de CO₂ pode ser resultado do aumento da concentração de CO₂ na atmosfera interna do fruto, o que segundo Brackmann et al. (2014), é resultado da menor taxa de difusão desse gás. Thewes et al. (2015) evidenciaram maior incidência de escurecimento de polpa em frutos que apresentavam maior concentração interna de CO₂ e no suco celular, resultando em dano celular e distúrbios fisiológicos, como o escurecimento da polpa. A maior incidência de escurecimento da polpa em ACD-QR e AC com 2 kPa de CO₂, pode ainda estar relacionado à redução da atuação das enzimas antioxidantes. SINGH e SINGH (2013) afirmam que o armazenamento em condições ótimas limita a produção de espécies reativas de oxigênio e permite a sua eliminação eficiente através da ação das enzimas antioxidantes, reduzindo a peroxidação lipídica da membrana.

Tabela 5 - Incidência de distúrbios fisiológicos em maçãs ‘Galaxy’ armazenadas por nove meses em atmosfera controlada dinâmica (ACD) e atmosfera controlada estática (AC) e seguidos por mais sete dias de exposição em condições ambiente (20 ± 1 °C e UR de $65\pm 5\%$).

Condição de armazenamento	Escurecimento de polpa (%)	Polpa farinácea (%)	Frutos sadios (%)
ACD-QR ¹	16,1 a*	11,9 c	71,5 a
ACD-FC ²	2,8 b	28,0 b	62,5 a
AC (1,2 kPa CO ₂) ³	8,4 ab	52,9 a	43,8 b
AC (1,6 kPa CO ₂) ⁴	8,6 ab	35,4 b	59,4 a
AC (2,0 kPa CO ₂) ⁵	13,3 a	24,5 b	70,8 a
C.V. (%)	21,7	10,5	5,8

Fonte: Produção do próprio autor, 2016. *Médias não seguidas da mesma letra nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

¹QR: quociente respiratório = 1,5 (0,21 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂)

²FC: fluorescência de clorofilas (0,4 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂)

³AC: 1,2 kPa O₂ + 1,2 kPa CO₂

⁴AC: 1,2 kPa O₂ + 1,6 kPa CO₂

⁵AC: 1,2 kPa O₂ + 2,0 kPa CO₂

O armazenamento em ACD-QR resultou em menor incidência de polpa farinácea (Tabela 5). A incidência de polpa farinácea aumenta com o avanço da maturação dos frutos (BOTH et al., 2014 b). A redução da incidência de polpa farinácea dos frutos armazenados em ACD-QR pode estar relacionada à redução da biossíntese de etileno nos frutos (dados não apresentados). Brackmann et al. (2014) e Thewes et al. (2015) relacionam o aumento desse distúrbio a maior concentração interna de etileno e maior taxa de produção de etileno dos frutos.

A AC com 1,2 kPa de CO₂ apresentou menor porcentagem de frutos sadios. As demais condições de

armazenamento não apresentaram diferenças entre si (Tabela 5). Embora o escurecimento de polpa tenha sido superior em ACD-QR e AC com 2 kPa de CO₂, não houve comprometimento do percentual de frutos sadios. Estes frutos são aqueles que não apresentaram nenhum sintoma de podridão e/ou dano interno ou externo, portanto, aptos para a comercialização e consumo. O maior percentual de frutos sadios em ambas as condições de ACD pode estar relacionado à menor taxa respiratória e de produção de etileno dos frutos (TEWHES et al., 2015). Na AC estática, o maior percentual de frutos saudáveis em 1,6 e 2,0 kPa de CO₂ demonstra o efeito benéfico do alto CO₂ neste sistema de armazenamento (BRACKMANN; WEBER; BOTH, 2015).

Mais trabalhos são necessários para elucidar qual o mecanismo responsável pelo maior conteúdo de CFT na polpa em ACD, bem como se há intensificação de determinadas rotas metabólicas que resultam em maior conteúdo de compostos fenólicos específicos na casca e na polpa de maçãs armazenadas em ACD-QR.

3.6 CONCLUSÃO

O armazenamento em ACD reduz o metabolismo, a perda da firmeza de polpa e a incidência de polpa farinácea de maçãs 'Galaxy'. O armazenamento em ACD resulta em frutos com maior conteúdo de compostos fenólicos totais na polpa em relação ao armazenamento em AC estática. A ACD-QR apresenta vantagens em relação às demais condições de armazenamento, por promover frutos com maior conteúdo de ácido clorogênico e procianidina B1 na casca e ácido clorogênico, epicatequina e catequina na polpa, compostos estes capazes de promover a saúde humana.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam a redução do conteúdo de compostos fenólicos individuais e totais e a atividade antioxidante total ao longo do desenvolvimento dos frutos em maçãs das cultivares Brookfield® e Mishima. A redução do conteúdo destes compostos ocorre em menor intensidade na casca, pois com o avanço do desenvolvimento há incremento de composto fenólicos específicos e no conteúdo de antocianinas totais.

O armazenamento em atmosfera controlada dinâmica, além de promover melhor manutenção dos atributos físico-químicos e de qualidade de maçãs ‘Galaxy’, resulta em frutos com maior conteúdo de compostos fenólicos totais na polpa em relação ao armazenamento em atmosfera controlada estática. A atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório apresenta vantagens, pois promove frutos com maior conteúdo de compostos específicos, nas porções de casca e polpa. Portanto, a utilização da atmosfera controlada dinâmica é uma boa alternativa para promover frutos com maior conteúdo de compostos capazes de promover a saúde dos consumidores. Entre as condições de atmosfera controlada estática, a condição de $1,2 \text{ O}_2 + 2,0 \text{ kPa CO}_2$ é a mais apropriada, pois além da manutenção dos atributos físico-químicos e de qualidade, resulta em frutos com maior conteúdo de compostos fenólicos totais na polpa e maior conteúdo de compostos específicos na casca e na polpa.

Com relação ao armazenamento em atmosfera controlada dinâmica, sugere-se para trabalhos futuros, investigar os mecanismos responsáveis pelo maior conteúdo de compostos fenólicos na polpa em atmosfera controlada dinâmica, bem como se há intensificação de determinadas rotas metabólicas que resultam em maior conteúdo de compostos fenólicos específicos na casca e na polpa de maçãs armazenadas em atmosfera controlada dinâmica monitorada pelo quociente respiratório. Sugere-se ainda, investigar se há

relação entre o sistema antioxidante enzimático e o maior conteúdo de compostos fenólicos individuais e totais na polpa de maçãs armazenadas em atmosfera controlada dinâmica.

Independente da cultivar avaliada, ficou evidente o maior conteúdo de compostos fenólicos individuais e totais além da maior atividade antioxidante na casca em relação à polpa. Esta maior bioatividade da casca já foi bem estudado na literatura estrangeira. Todavia, há um consenso geral de que a polpa é a porção que mais contribui no aporte de compostos fenólicos e antioxidantes, devido a porcentagem de casca dos frutos ser muito inferior à de polpa e porque a casca tende a ser frequentemente descartada pelos consumidores.

O consumo de frutas, incluindo maçãs, está associado à redução de uma série de doenças degenerativas. No Brasil, a maçã é a terceira fruta mais consumida, no entanto, a literatura brasileira carece de trabalhos na área de pós-colheita relacionados ao conteúdo de compostos bioativos. Praticamente toda a produção de maçãs é armazenada para que possa ser oferecida aos consumidores ao longo do ano. Portanto, a utilização de tecnologias que promovam frutos de qualidade, aliada a possibilidade de oferecer frutos com maior conteúdo de compostos bioativos, contribuem no aumento do aporte de antioxidantes oriundos da dieta, proporcionado benefícios na saúde dos consumidores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPM. Associação Brasileira de Produtores de Maçã. **Brazilian apple industry: Production by varieties**. 2014. Disponível em <<http://abpm.org.br>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Science**, Shannon, v.196, n.1, p.67-76, 2012.

AGATI, G. et al. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v.72, n.1, p.35-45, 2013.

ALONSO-SALCES, R.M. et al. Classification of apple fruits according to their maturity state by the pattern recognition analysis of their polyphenolic compositions. **Food Chemistry**, Barking, v.93. n.1, p.113-123, 2005.

AMAKI, K. et al. Role of Chlorogenic Acid Quinone and Interaction of Chlorogenic Acid Quinone and Catechins in the Enzymatic Browning of Apple. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Oxford, v.75, n.5, p.829–832, 2011.

ANDRE, C. H. M. et al. Anti-inflammatory procyanidins and triterpenes in 109 apple varieties. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.60, n.42, p.10546-10554, 2012.

BAE, R.; KIM, K. Anatomical observations of anthocyanin rich cells in apple skins. **HortScience**, Alexandria, v.41, n.3, p.733-736, 2006.

BAGCHI, K.; PURI, S. Free radicals and antioxidants in health and disease: a review. **Eastern Mediterranean Health Journal**, Amsterdam, v.4, n.2, p.350–360, 1998.

BALASURIYA, N.; RUPASINGHE, H.P. Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract. **Food Chemistry**, Barking, v.135, n.4, p.2320–2325, 2012.

BESSEMANS N. et al. A novel type of dynamic controlled atmosphere storage based on the respiratory quotient (RQ-DCA). **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.115, n.1, p.91–102, 2016.

BI, X. et al. Anthocyanin contributes more to hydrogen peroxide scavenging than other phenolics in apple peel. **Food Chemistry**, Barking, v.152, n.1, p.205–209, 2014.

BIDEL, S.; HU, G.; TUOMILEHTO, J. Coffee consumption and type 2 diabetes– an extensive review. **Central European Journal of Medicine**, Berlin, v.3, n.1, p.9-19, 2008.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.90, n.2, p.157-177, 2001.

BIZJAK, J. et al. Changes in primary metabolites and polyphenols in the peel of “Braeburn” apples (*Malus domestica* Borkh.) during advanced maturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.61, n.43, p.10283–10292, 2013a.

BIZJAK, J. et al. Influence of phosphate Ca on color development and anthocyanin content of ‘Braeburn’ apple

(*Malus domestica* Borkh.). **Hortscience**, Alexandria, v.48, n.2, p.193–199, 2013b.

BOLLING, B.W.; CHEN, Y.Y.; CHEN, C.Y.O. Contributions of phenolics and added vitamin C to the antioxidant capacity of pomegranate and grape juices: synergism and antagonism among constituents. **International Journal of Food Science and Technology**, Nova Iorque, v.48, n.12, p.2650-2658, 2013.

BONITA, J. S. et al. Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. **Pharmacological Research**, Londres, v.55, n.3, p.187-198, 2007.

BOQUÉ, N. et al. Prevention of diet-induced obesity by apple polyphenols in Wistar rats through regulation of adipocyte gene expression and DNA methylation patterns. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v.57, n.8, p.1473-1478, 2013.

BOTH, V. et al. Effect of storage under extremely low oxygen on the volatile composition of ‘Royal Gala’ apples. **Food Chemistry**, Barking, v.156, n.1, p.50-57, 2014a.

BOTH, V. et al. Estresse inicial por baixo oxigênio seguido do armazenamento em atmosfera controlada de maçãs ‘Royal Gala’. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.45, n.4, p.708-718, 2014b.

BOUAYED, J. Polyphenols: A potential new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. **Current Nutrition and Food Science**, Boston, v.6, n.1, p.13–18, 2010.

BOUAYED, J. et al. Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their

native patterns. **Food Chemistry**, Barking, n.4, v.131, p.1466–1472, 2011.

BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants – Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Nova Iorque, v.3, n.4, p.228–237, 2010.

BOYER, J.; LIU, R. H. Apple phytochemicals and their health benefits. **Nutrition Journal**, Londres, v.3, n.1, p. 1-15, 2004.

BRACKMANN, A. et al. Armazenamento de maçãs ‘Royal Gala’ sob diferentes temperaturas e pressões parciais de oxigênio e gás carbônico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.532-536, 2001.

BRACKMANN, A. et al. Aplicação de 1-metilciclopropeno e absorção de etileno em maçãs cultivar ‘Royal Gala’ colhidas tardiamente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.10, p.2074-2080, 2010.

BRACKMANN, A. et al. Effect of growth regulators on ‘Brookfield’ apple gas diffusion and metabolism under controlled atmosphere storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.49, n.5, p.323-329, 2014.

BRACKMANN, A.; WEBER, A.; BOTH, V. CO₂ Partial Pressure for Respiratory Quotient and HarvestWatch™ Dynamic Controlled Atmosphere for ‘Galaxy’ Apples Storage. **Acta Horticultural**, Lemesos, v.1, n.1079, p.435-440, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.

LWT-Food Science and Technology, Lincoln, v. 28, n.1, p.25-30, 1995.

BRAT, P. et al. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. **Journal of Nutrition**, Rockville, v.136, n.9, p.2368–2373, 2006.

CARBONE, K. et al. Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. **Food Chemistry**, Barking, v.127, n.2, p.493-500, 2011.

CARRASCO-POZO, C. et al. Apple peel polyphenols protect against gastrointestinal mucosa alterations induced by indomethacin in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.59, n.12, p.6459–6466, 2011.

CEYMAN, M. et al. Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. **Journal of Food Composition and Analysis**, Nova Iorque, v.26, n.1, p.128-135, 2012.

CHAI, S. C. et al. Daily apple versus dried plum: impact on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, Nova Iorque, v.112, n.8, p-1158-1168, 2012.

CHEN, J. et al. A genome-wide microarray highlights the anti-inflammatory genes targeted by oolong tea theasinensin A in macrophages. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v.63, n.7, p.1064-1073, 2011.

CONDEZO-HOYOS, L.; MOHANTY, I. P.; NORATTO, G. D. Assessing non-digestible compounds in apple cultivars and

their potential as modulators of obese faecal microbiota in vitro. **Food Chemistry**, Barking, v.161, n., p.208-215, 2014.

DENIS, M. C. et al. Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. **Public Library of Science**, San Francisco, v.8, n.1, e53725, 2013.

DEUCHANDE, T. et al. Internal browning disorders during storage of ‘Rocha’ pear: effects of harvest maturity and CO₂ partial pressure. In: X Simposio Nacional y VII Ibérico sobre Maduración y Postcosecha, 2012, Lleida. **Avances en Poscosecha de frutas y hortalizas**, Universitat de Lleida, 2012, p. 583-587.

DROGOUDI, P.D., MICHAELIDIS, Z., PANTELIDIS, G. Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.115, n.12, p.149-153, 2008.

DROGOUDI, P. D.; PANTELIDIS, G. Effects of position on canopy and harvest time on fruit physico-chemical and antioxidant properties in different apple cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.129, n.4, p.752-760, 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Apple**. 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

FELICETTI, E.; MATTHEIS, J. P. Quantification and histochemical localization of ascorbic acid in “Delicious,” “Golden Delicious,” and “Fuji” apple fruit during on-tree development and cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.56, n.1, p.56–63, 2010.

FIORAVANÇO, J. C.; CZERMAINSKI, A. B. C.; OLIVEIRA, P. R. D. de. **Avaliação da Cultivar de Macieira Baigent (Brookfield®) em Vacaria, RS**. Comunicado técnico 140, Bento Gonçalves, 2013.

FIORAVANÇO, J. C. et al. Avaliação da cultivar de macieira Mishima em Vacaria, RS. Comunicado técnico 124, Bento Gonçalves, 2012.

FLOEGEL, A. et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, Amsterdam, v.24, n.7, p.1043-1048.

FLORA, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Austin, v.2, n.4, p.191-206, 2009.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; LEVIN, C. E. Bactericidal activities of health-promoting, food-derived powders against the foodborne pathogens *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, Champaign, v.78, n.2, p.270-275, 2013.

FULEKI, T; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, Nova Iorque York, v.33, n.1, p.72-77, 1968.

GEORGÉ, S. et al. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived products. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53. n. 5, p. 1370-1373, 2005.

GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v.12, n. 4, p.7-15, 2006.

GWANPUA, S. G. et al. Kinetic modeling of firmness breakdown in 'Braeburn' apples stored under different controlled atmosphere conditions. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 67, n.1, p.68-74, 2012.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants-quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v.32, n.3, p.125-130, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Nova Iorque, v.119, n.6, p.598-620, 1992.

HARKER, F. R.; GUNSON, F. A.; JAEGER, S. R. The case for fruit quality: an interpretive review of consumer attitudes, and preferences for apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.28, n.3, p.333-347, 2003.

HE, R. R. et al. Protective effect of apple polyphenols against stress-provoked influenza viral infection in restraint mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.59, n.8, p.3730-3737, 2011.

HO, Q. T. et al. Genotype effects on internal gas gradients in apple fruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.61, n.10, p.2745-2755, 2010.

HO, Q. T. et al. A three-dimensional multiscale model for gas exchange in fruit. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.155, n.3, p.1158-1168, 2011.

HO, Q. T. et al. Controlled atmosphere storage may lead to local ATP deficiency in apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.78, n.1, p.103-112, 2013.

HOANG, N.T.T.; GOLDING, J.B.; WILKES, M.A. The effect of postharvest 1-MCP treatment and storage atmosphere on ‘Cripps Pink’ apple phenolics and antioxidant activity. **Food Chemistry**, Barking, n.3, v.127, p.1249–1256, 2011.

HOOSHMAND, S. et al. Comparative effects of dried plum and dried apple on bone in postmenopausal women. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.106, n.6, p.923-930, 2011.

HOSSAIN, T. et al. Variety Descriptions. **Plant Varieties Journal**, Canberra, v. 15, n. 2, p. 43, 2002.

HYSON, D. A. A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. **American Society of Nutrition**, Bethesda, v.2, n.5, p.408-420, 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Aquisição alimentar domiciliar per Capita Brasil e grandes regiões, 2009**. Disponível em: <<http://ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

IGLESIAS, I.; ECHEVERRÍA, G.; SORIA, Y. Differences in fruit colour development, anthocyanin content, fruit quality and consumer acceptability of eight ‘Gala’ apple strains. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.119, n.1, p.32-40, 2008.

JAKOBEK, L. et al. Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region. **Journal of Food Composition and Analysis**, Amsterdam, v.31, n.2, p.199-211, 2013.

JEDRYCHOWSKI, W. et al. Case-control study on beneficial effect of regular consumption of apples on colorectal cancer risk in a population with relatively low intake of fruit and vegetables. **European Journal Cancer Prevention**, Oxford, v.19, n.1, p.42-47, 2010.

JIN, D. et al. Antiobesity and lipid lowering effects of theaflavins on high-fat diet induced obese rats. **Journal of Functional Foods**, Richardson, v.5, n.4, p.1142-1150, 2013.

KALINOWSKA, M. et al. Apples: content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v.84, n.1, p.169-188, 2014.

KANNO, H. et al. Protective effects of glycoumarin and procyanidin B1, active components of traditional Japanese medicine yokukansan, on amyloid β oligomer-induced neuronal death. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.159, n.1, p.122-128, 2015.

KEVERS, C. et al. Influence of cultivar, harvest time, storage conditions, and peeling on the antioxidant capacity and phenolic and ascorbic acid contents of apples and pears. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.59, n.11, p.6165-6171, 2011.

KIDDLE, K. W. Stark Brothers Nurseries and Orchards Company. United States. U.S. Patent, 6955. 1989.

KOMATSU, H. Red Fuji in Japan: choosing the best strain for your business strategy. **Compact Fruit Tree**, Middleburg, v. 31, n. 2, p. 44–45, 1998.

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

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

LEE, K. W. et al. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p.6516- 6520, 2003.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, Barking, v.125, n.2, p.288-306, 2011.

LI, Y. et al. Low molecular weight apple polysaccharides induced cell cycle arrest in colorectal tumor. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v.64, n.3, p.439-463, 2012.

MARTINEZ-MICAELO, N. et al. Procyanidin B2 inhibits inflammasome-mediated IL-1b production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v.59, n.2, p.262-269, 2015.

McGHIE, T. K.; HUNT, M.; BARNETT, L. E. Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic

concentration and composition of apples grown in New Zealand. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, n.8, p.3065–3070, 2005.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, Londres, v.5, n.35, p.27986–28006, 2015.

NORTON, R. A.; WAY, R. D. Apple. In: OKIE, W. R (Ed.). Register of new fruit and nut varieties: list 39. **HortScience**, Alexandria, v. 34, n. 2, p. 181-205, 1999.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **A healthy lifestyle**. 2016. Disponível em: < <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

PAL, D. K.; NIMSE, S. B. Screening of the antioxidant activity of *Hydrilla verticillata* plant. **Asian Journal of Chemistry**, Ghaziabad, v.18, n.4, p.3004–3008, 2006.

PALAFIX-CARLOS, H.; AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. **Journal of Food Science**, Malden, v.76, n.1, p.6-15, 2011.

PANZELLA, L. et al. A reappraisal of traditional apple cultivars from Southern Italy as a rich source of phenols with superior antioxidant activity. **Food Chemistry**, Barking, v.140, n.4, p.672–679, 2013.

PETKOVSEK, M. M. et al. The influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a 2-year period. **Journal of the science of food and agriculture**, Londres, v.90, n.14, p.2366-2378, 2010.

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

PETRI, J. L. et al. Avanços na cultura da macieira no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Volume especial, E. p.48-56, 2011.

PLAZA, M; KARIUKI, J.; TURNER, C. Quantification of Individual Phenolic Compounds' Contribution to Antioxidant Capacity in Apple: A Novel Analytical Tool Based on Liquid Chromatography with Diode Array, Electrochemical, and Charged Aerosol Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.62, n.2, p.409-418, 2014.

POLJSAK, B.; DUŠAN ŠUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Nova Iorque, v.2013, n.1, p. 1-11, 2013.

POWELL, W. H. Revised nomenclature for radicals, ions, radical ions and related species (IUPAC Recommendations 1993). **Pure and Applied Chemistry**, Berlin, v.65, n.6, p.1357-1455, 1993.

PRANGE, R. K. et al. Method and apparatus for monitoring a condition in chlorophyll containing matter. U.S. Patent, n.WO/2002/006795, 2007.

PRINCE, P. D. et al. Dietary (-)-epicatechin mitigates oxidative stress, NO metabolism alterations, and inflammation in renal cortex from fructose-fed rats. **Free Radical Biology and Medicin**, Nova Iorque, v.90, n.1, p.35-46, 2016.

RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Nova Iorque, v.18, n.7, p.427-442, 2007.

RAPASINGHE, H. P. V.; WANG, Y.; THILAKARATHNA, S. K. P. H., Apple skin extract for treating cardiovascular disease, patent n°. WO201147028 A2, publication date: 2011.12.01.

REBER, J. D.; EGGETT, D. L.; PARKER, T. L. Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries. **International Journal of Food Science and Nutrition**, Basingstoke, v.62, n.5, p.445-452, 2011.

RILEY, P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, Londres, v.65, n.1, p.27-33, 1994.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p.53-60, 2007.

ROUNDS, L. et al. Plant extracts, spices, and essential oils inactivate *Escherichia coli* O157:H7 and reduce formation of potentially carcinogenic heterocyclic amines in cooked beef patties. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.60, n.14, p.3792-3799, 2012.

ROUNDS, L. et al. Concentration-dependent inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and heterocyclic amines in heated ground beef patties by apple, olive, and onion powders and clove bud oil. **American Meat Science Association**, Barking, v.94, n.4, p.461-467, 2013.

RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia científica:** determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza: Embrapa, Comunicado Técnico, n.127, 4 p., 2007.

RUIJTERS, E. J. B. et al. The cocoa flavanol (-)-epicatechin protects the cortisol response. **Pharmacological Research**, Kansas, v.79, n.1, p.28-33, 2014.

SAS INSTITUTE. **Getting started with the SAS learning edition**. Cary: SAS Institute, 2002. 200p.

SCHROETER, H. et al. Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: Current knowledge and future needs. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v.31, n.6, p.546-557, 2010.

SERRA, A. T. et al. Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2 - Antioxidant and antiproliferative activities. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v.2, n.1, p.46-53, 2010.

SERRA, A. T. et al. Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties – Correlation of response with composition. **Food Chemistry**, Barking, v.135, n.4, p.2378-2383, 2012.

SETORKI, M. et al. Effects of apple juice on risk factors of lipid profile, inflammation and coagulation, endothelial

markers and atherosclerotic lesions in high cholesterolemic rabbits. **Lipids in health and disease**, London, v.8 n.39, p. 1-9, 2009.

SHAHIDI, F; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.112, n.9, p.930–940, 2010.

SINGH, S. P.; SINGH, Z. Controlled and modified atmospheres influence chilling injury, fruit quality and antioxidative system of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). **International Journal of Food Science and Technology**, Nova Iorque, v.48, n.2, p.363–374, 2013.

SOLOVCHENKO, A.; SCHMITZ-EIBERGER, M. Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.54, n.389, p.1977-1984, 2003.

SONG, Y. et al. Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. **Journal of American College of Nutrition**, Nova Iorque, v.24, n.5, p.376-384, 2005.

THEWES, F. R. et al. Dynamic controlled atmosphere and ultralow oxygen storage on ‘Gala’ mutants quality maintenance. **Food Chemistry**, Barking, v.188, n.1, p.62-70, 2015.

TSAO, R. et al. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, n.22, p.6347-6353, 2003.

TSAO, R. et al. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, n.12, p.4989-4995, 2005.

VALAVANIDIS, A. et al. Polyphenolic profile and antioxidant activity of five apple cultivars grown under organic and conventional agricultural practices. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.44, p.1167–1175, 2009.

VEERIAH, S. et al. Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.55, n.15, p.2892-2900, 2007.

VIDAL, R. et al. Apple procyanidins decrease cholesterol esterification and lipoprotein secretion in Caco-2/TC7 enterocytes. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v.46, n.2, p.258-268, 2005.

VIEIRA, F. G. K. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of the apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.128, n.3, p.261-266, 2011.

VINSON, J. A. et al. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, n.11, p.5315–5321, 2001.

VOLZ, R. K.; MCGHIE, T. K. Genetic variability in apple fruit polyphenol composition in *Malus x domestica* and *Malus sieversii* germplasm grown in New Zealand. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.59, n.21, p.11509-11521, 2011.

WANG, S. et al. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.59, p.960-968, 2011.

WAPA - **The world apple and pear association**. Disponível em: http://www.wapa-association.org/docs/2010/Facts_and_Figures/Gain_report_Brazil_2009.pdf. Acesso em: 15 de julho de 2015.

WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; LASKOWSKI, P. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.56, p.6520-30, 2008.

WRIGHT, H. et al. The effect of temperature and other factors on chlorophyll fluorescence and the lower oxygen limit in apples (*Malus domestica*). **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.55, n.1, p.21–28, 2010.

WRIGHT, H. et al. Dynamic controlled atmosphere (DCA): does fluorescence reflect physiology in Storage? **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.64, n.1, p.19–30, 2012.

WRIGHT, A. H. et al. The trend toward lower oxygen levels during apple (*Malus × domestica* Borkh) storage - A review. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Oxford, v.90, n.1, p.1-13. 2015.

YAMASHITA, Y. et al. Cinnamtannin A2, a tetrameric procyanidin, increases GLP-1 and insulin secretion in mice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Toquio, v.77, n.4, p.888-891, 2013.

YAN, S. et al. Maturity and cooling rate affects browning, polyphenol oxidase activity and gene expression of 'Yali' pears during storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.85, n.1, p.39–44, 2013.

YANG, S. et al. Evaluation of antioxidative and antitumor activities of extracted flavonoids from Pink Lady apples in human colon and breast cancer cell lines. **Food and Function**, Cambridge, v.6, n.1, p.3789-3798, 2015.

YAO, N. et al. Hypotriglyceridemic effects of apple polyphenols extract via up-regulation of lipoprotein lipase in triton WR-1339-induced mice. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, Beijing, v.20, n.1, p.31-35, 2014.

ZANELLA, A. Control of apple superficial scald and ripening - a comparison between 1-methylcyclopropene and diphenylamine postharvest treatments, initial low oxygen stress and ultra low oxygen storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.27, n.1, p.69-78, 2003.

ZHANG, Y.; LI, P.; CHENG, L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.123, n.4, p.1013-1018, 2010.

ZHENG, H.; KIM, Y.; CHUNG, K. A profile of physicochemical and antioxidant changes during fruit growth for the utilization of unripe apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.131, n.1, p.106-110, 2012.