AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DO EXTRATO FENÓLICO DE BAGAÇO DE MAÇÃ

Francimara Mariana Marques (BIC/Fundação Araucária), Danianni M. Zardo (Co-orientadora), Alessandro Nogueira (Orientador), e-mail: alessandronog@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Engenharia de Alimentos.

Ciência e Tecnologia de Alimentos/ Ciência de Alimentos.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, FRAP, DPPH.

Resumo

Bagaço da maçã é o resíduo sólido do processo de extração do suco e mosto, que apresenta elevado teor de compostos fenólicos. O objetivo deste estudo foi extrair os compostos fenólicos, livres e ligados do bagaço de maçã, e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato fenólico de bagaço de maçã. O extrato fenólico livre foi obtido por extração com acetona 55% e para a recuperação dos fenólicos ligados testou-se três métodos de hidrólise alcalina e ácida. Nas frações obtidas foi analisado o teor de fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante. Dentre as frações ligadas, a obtida por hidrólise com ultrassom (M1), foi a que apresentou maior conteúdo de fenóis e atividade antioxidante (FRAP). A fração ligada obtida por hidrólise com agitação (M2) e pelo método M1 apresentaram maior recuperação de flavonoides. Utilizando o método de DPPH, a fração ligada obtida de M2 obteve melhor resultado. A atividade antimicrobiana do extrato fenólico livre foi de baixa a moderada. O método usado na extração de fenólicos livres em bagaço de maçã foi eficiente e a hidrólise da fração ligada aumentou a extração dos compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

Introdução

O bagaço de maçã é o resíduo da extração do suco e mosto; sua composição química engloba água, ácidos carboxílicos, açúcares, fibras e compostos fenólicos (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). Os fenóis podem ser definidos quimicamente como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxilas, incluindo seus derivados funcionais. Em maçãs podem ser encontradas as classes dos flavonoides e ácidos fenólicos (SHAHIDI; NACZK, 2004).

Os compostos fenólicos antioxidantes podem ser encontrados sob diferentes formas na microestrutura alimentar e classificados em livres de interação química ou física com as macromoléculas; fisicamente aprisionados em diferentes estruturas celulares; ligados quimicamente a estruturas celulares; e material antioxidante insolúvel (GÖKMEN et al., 2009).

A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos vem sendo cada vez mais estudada, devido à procura por compostos naturais capazes de agir como bactericidas, uma vez que, estes compostos não causam resistência ou mutações em microrganismos patogênicos (BARRECA et al., 2014).

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a extração dos compostos fenólicos livres e da fração ligada aos constituintes do bagaço de maçã, utilizando diferentes

metodologias e determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato fenólico.

Materiais e Métodos

O bagaço de maçã (cv. Gala) foi obtido conforme protocolo pré-estabelecido pelo Grupo de Trabalho de Maçã, seguido de trituração (moinho de facas, Tec Mill TE-633, Tecnal, SP, Brasil) e homogeneização através de tamização a 28 *mesh.*

Os fenólicos livres foram extraídos com auxílio de acetona 55%, a 10 ºC por 20 min.). Após, os sobrenadantes foram centrifugados (8160 *g*, 40 min. a 4 ºC - HITACHI – HIMAC CR21 GII) e rotaevaporados (TE-211, TECNAL) a 50 ºC (± 2ºC). Os extratos foram armazenados em temperatura de -20ºC (± 2ºC). Com o resíduo remanescente da extração dos fenólicos livres, procedeu-se a extração dos compostos fenólicos ligados, utilizando três métodos diferentes, codificados como *M1* (SUMCZYNSKI et al., 2016); *M2* (MATTILA et al., 2006) e *M3* (FAN; BETA, 2015).

Em ambos os extratos fenólicos o teor de fenólicos totais (SINGLETON; ROSSI, 1978); flavonoides totais (ZHISHEN; MENGEHENG; JIANMING, 1999) e atividade antioxidante por DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) e FRAP (BENZIE; STRAIN, 1996) foram analisados.

A atividade antimicrobiana da fração fenólica livre foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI; 2009). As cepas utilizadas foram *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, ATCC 6538) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ATCC 13076). A inibição do crescimento microbiano foi calculada de acordo com a equação abaixo:

Inibição do crescimento (%) = 100 – [(ABS amostra x 100)/ABS controle positivo]

Onde: 'ABS amostra' refere-se à absorbância do crescimento microbiano frente à presença do extrato; 'ABS controle positivo' refere-se à absorbância do crescimento microbiano sem a presença do extrato fenólico.

Resultados e Discussão

O teor de fenólicos totais (livres) para o bagaço de maçã foi de 17653 mg kg^{-1} (Tabela 1). Estudo realizado por Sato et al. (2010) encontrou valores de fenóis entre 2290 e 8560 mg kg^{-1} em bagaço de diferentes cultivares de maçã, demonstrando que o método de extração utilizado neste estudo foi eficiente. A metodologia M1 de extração de fenólicos ligados foi a que obteve maior recuperação, comparado as outras metodologias testadas, com valores até 6 vezes superiores (Tabela 1).

Comparando as metodologias utilizadas para obtenção dos fenólicos ligados, ambas utilizaram hidrólise alcalina, seguida de hidrólise ácida. Porém, nos métodos M2 e M3, a fração ligada é separada da amostra pela adição de solventes orgânicos, os quais podem ter proporcionado perda de fenóis totais nas frações ligadas.

No que se refere ao teor de flavonoides, o extrato fenólico livre demonstrou teores de 6266 mg kg^{-1}, sendo este condizente com estudo de Alberti et al. (2017). A composição fenólica do bagaço de maçã apresenta teores superiores de flavonoides, comparado aos ácidos fenólicos, os quais são oxidados durante seu processo de obtenção (NICOLAS et al.,1994). A metodologia M2 recuperou maiores teores de flavonoides (78% dos fenólicos totais), comparado à metodologia M1 e M3 (23 e 15% dos fenólicos, respectivamente).

Tabela 1: Teor de fenóis totais e flavonoides totais (mg kg^{-1}, de catequina), FRAP (µmol TE kg^{-1}) e DPPH (µmol TE kg^{-1}) nas frações fenólicas livres e ligadas em bagaço de maçã Gala

Frações	Fenóis Totais	Flavonoides Totais	Atividade Antioxidante	
			FRAP	DPPH
Fenólicos livres	17653 ±1092,48	6266 ±601,03	20740 ±1399,23	21692 ±548,10
Fenólicos ligados				
M1*	10193 ± 905,63	2354 ± 142,65	12056 ± 323,79	2577 ± 341,7
M2*	3024 ± 242,67	2371 ± 105,44	6743 ± 218,75	9333 ± 115,12
M3*	1694 ± 137,66	269 ± 76,53	1591 ± 91,26	1008 ± 130,83

*Nota: M1 (SUMCZYNSKI et al., 2016); M2 (MATTILA et al., 2006); M3 (FAN; BETA, 2015). Resultados expressos em base seca.

A atividade antioxidante do extrato fenólico ligado obtido pelo método M1 se mostrou superior quando comparado as outras metodologias. Luo et al. (2016) demonstraram que a fração ligada dos fenóis em casca de maçã Fuji, obteve maiores valores para a atividade antioxidante, analisada pelo método de FRAP, que a fração livre, diferente do encontrado neste estudo. Isto pode ter ocorrido pelo fato dos fenólicos terem sido detectados em maiores quantidades na fração livre. Se tratando da análise de DPPH, este mesmo autor encontrou para as frações livres da casca maiores resultados do que para as frações ligadas, assim como observado neste estudo.

Com relação a atividade antimicrobiana, o extrato fenólico livre na concentração de 5000 µg mL^{-1}, inibiu em 34% a cepa de *S. enterica*, enquanto a cepa de *E. coli* teve uma redução de 18% em seu crescimento em concentração de 1250 µg mL^{-1}. O extrato fenólico livre não promoveu inibição da cepa de *S. aureus*.

Conclusões

Os resultados deste trabalho demonstraram que o método utilizado para a extração de fenólicos livres em bagaço de maçã foi eficiente na extração destes compostos. Porém, o conteúdo de fenóis totais e flavonoides totais pode aumentar, (37% e 27,5%, respectivamente), se a fração ligada for extraída do bagaço de maçã.

Dentre as três metodologias testadas para a extração de fenólicos ligados, a que apresentou maior recuperação dos compostos foi a de Sumczynski et al. (2016), sendo o bagaço hidrolisado e os compostos extraídos com auxílio de banho de ultrassom (valores até 6 vezes superiores aos outros métodos). Este trabalho demonstrou que a atividade antioxidante dos extratos fenólicos também pode aumentar quando os compostos ligados são extraídos.

A atividade antimicrobiana do extrato fenólico livre foi de baixa a moderada, com inativação de 18% da cepa de *E. coli* e de 34% da cepa de *S. enterica*, em concentrações de 1250 e 5000 µg mL^{-1}, respectivamente.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Estadual de Ponta Grossa pela disponibilidade dos laboratórios, a Fundação Araucária pela bolsa, aos membros do Grupo de Trabaho sobre Maçã pelo apoio, ao Profº Dr. Alessandro Nogueira e a Doutoranda Danianni Zardo pelas orientações.

Referências

ALBERTI et al. Distribution of phenolic compounds and antioxidant capacity in apples tissues during ripening. **Journal of Food Science and Technology**. v. 54, n8, p. 1511–1518, 2017.

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

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry.** v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel – Wissenschaft und -Technologie**, v. 22, p. 25-30, 1995.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard M7-A8, 8th ed. (2009b). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

FAN, G.; BETA, T. Discrimination of geographical origin of Napirira bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on phenolic profiles and antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis.** Manitoba, p. 217-222, 2015.

GÖKMEN, V.; SERPEN, A.; FOGLIANO, V. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. **Trends in Food Science & Technology,** v. 20, n. 6, p. 278-288, 2009.

LUO, J.; ZHANG, P.; LI, S.; SHAH, N. P. Antioxidant, antibacterial, and antiproliferative activities of free and bound phenolics from peel and flesh of fuji apple. **Journal of Food Science,** v. 81, n 7, p 1735-1742, 2016.

MATTILA, P.; HELLSTROM, J.; TORRONEN, R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7193-7199, 2006.

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

NOGUEIRA, A., WOSIACKI, G. Apple Cider Fermentation. In Hui, Y. H.; ÖZGÜL EVRANUZ, E. (Eds.), **Handbook of plant-based fermented food and beverage technology** Boca Raton, USA: CRC Press, p. 209-236, 2012.

SATO, M. F., VIEIRA, R. G., ZARDO, D. M., FALCÃO, L. D., NOGUEIRA, A., & WOSIACKI, G. Apple pomace from eleven cultivars: an approach to identify sources of bioactive compounds. **Acta Scientiarum. Agronomy.** v. 32, n. 1, p. 29-35, 2010.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in food and nutraceuticals. Florida: CRC Press, p. 558, 2004.

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

SUMCZYNSKI, D., KOTÁSKOVÁ, E., DRUŽBÍKOVÁ, H., MLČEK, J. Determination of contents and antioxidant activity of free and bound phenolics compounds and in vitro digestibility of commercial black and red rice (*Oryza sativa L.*) varieties. **Food Chemistry**, v. 211, p.339-346, 2016.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry,** v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.