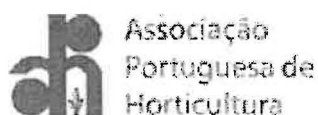




3º Simpósio Nacional de Fruticultura

Vila Real, 4 e 5 de dezembro de 2014



Ficha Técnica:

Título: 2º Simpósio Nacional de Fruticultura

Colecção: Actas Portuguesas de Horticultura, nº 23

Editor: ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE HORTICULTURA

Rua da Junqueira, 299 – 1300-338 Lisboa

Coordenação: Raúl Rodrigues e Ana Paula Silva

Autores: vários

Edição e Coordenação: Raúl Rodrigues e Ana Paula Silva

Tiragem: 200 exemplares

ISBN: 978-972-8936-16-7

Caracterização físico-química e atividade antioxidante da casca de diferentes cultivares de romã produzidas em Espanha

Luana Fernandes¹, José Alberto Pereira¹, Isabel López-Cortés², Domingo M. Salazar², & Elsa Ramalhosa¹

¹ CIMO-Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Campus de Stª Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal, luana.f.1987@gmail.com, jpereira@ipb.pt, elsa@ipb.pt

² Universidade Politécnica de Valência, Camino de Vera s/n, 46022 Valência, Espanha, islocor@esp.upv.es, dsalazar@prv.upv.es

Resumo

A casca de romã é um subproduto importante da indústria de bebidas elaboradas à base deste fruto. Até ao momento, geralmente a casca não é utilizada para outros fins, sendo desperdiçada. Nesse sentido, de forma a valorizar este subproduto, o presente estudo teve como objetivo proceder à determinação da presença de taninos hidrolisáveis, flavonóides e atividade antioxidante da casca de nove cultivares produzidas em Espanha.

Os resultados demonstraram que as cultivares estudadas apresentaram diferenças nas percentagens de casca (36,2 a 57,7% para a Parfianka e Cis 127, respetivamente), bem como na sua cor. A cultivar White foi aquela que apresentou os valores mais baixos de luminosidade (L^*) e das coordenadas a^* (verde-vermelho⁺) e b^* (azul-amarelo⁺). Em relação à atividade antioxidante, a cultivar Valenciana destacou-se face às restantes, apresentando os valores mais elevados de flavonóides (546 mg QE g⁻¹ extrato), taninos hidrolisáveis (2109 mg TAE g⁻¹ extrato), Capacidade Redutora Total (1510 mg GAE g⁻¹ extrato), Efeito Bloqueador dos Radicais Livres de DPPH (menor valor de EC₅₀ e igual a 6,93 mg L⁻¹) e Poder Redutor (menor valor de EC₅₀ e igual a 41,8 mg L⁻¹), sendo a casca com a maior quantidade em compostos bioativos. Além disso, outras cultivares, tais como a Cis 127, Mollar de Elche e Wonderful 1, apresentaram características importantes, como sejam, elevado teor em flavonóides, taninos e Capacidade Redutora Total. Pelo contrário, de um modo geral, a casca da cultivar Katirbasi foi a que apresentou os valores inferiores nessas propriedades.

Em suma, o presente trabalho demonstrou que as cascas de cultivares de romã podem ser reutilizadas e os seus extratos incorporados em outros produtos alimentares, tendo em conta os compostos detetados que são referidos na literatura como tendo efeitos positivos na saúde humana.

Palavras-chave: *Punica granatum* L., Cor, Taninos, Flavonóides.

Abstract

Pomegranate skin is a significant byproduct of pomegranate based beverage industry. So far, pomegranate skin is generally not used for other purposes, being wasted. Accordingly, in order to valorize this byproduct, the present study aimed to determine the presence of hydrolysable tannins and flavonoids, as well as the antioxidant activity of skin of nine cultivars grown in Spain.

The results showed that the nine cultivars had different skin percentages (36.2 to 57.7% for Parfianka and Cis 127, respectively), as well as color. White cultivar presented the lowest values of luminosity (L^*) and a^* (green-red⁺) and b^* (blue-yellow⁺) coordinates. Regarding antioxidant activity, the Valenciana cultivar stood out over the others, with the highest contents of flavonoids (546 mg QE g⁻¹ extract), hydrolyzable tannins (2109 mg TAE g⁻¹ extract), Total Reducing Capacity (1510 mg GAE g⁻¹ extract), blocking effect of DPPH free radical (the lowest EC₅₀ value, equal to 6.93 mg L⁻¹) and Reducing Power (the lowest EC₅₀ value, equal to 41.8 mg

L⁻¹). So, it was the skin with the highest amount of bioactive compounds. In addition, other cultivars, such as Cis 127, Mollar de Elche and Wonderful 1, showed important characteristics such as high content of flavonoids, tannins and Total Reducing Capacity. On contrary in general the skin of Katirbasi cultivar showed the lowest values in these properties.

In summary, the present study showed that the skins of these nine pomegranate cultivars can be reused and their extracts incorporated into other food products, taking into account the detected compounds that are referred in the literature as having positive effects on human health.

Keywords: *Punica granatum* L., Color, Hydrolysable tannins, Flavonoids, Antioxidant activity

Introdução

Espanha é o maior produtor europeu de romã, estando a sua produção localizada principalmente nas províncias da Comunidade Valenciana. A casca representa cerca de 50% do peso do fruto e é referida por vários autores como sendo uma boa fonte de compostos fenólicos, tais como flavonóides (antocianinas e catequinas) e taninos hidrolisáveis (punicalina, punicalagina, ácido gálico e ácido elágico) (Caliskan et al. 2012; Fawole et al. 2012; Ismail et al. 2012).

Nos últimos anos tem havido uma preocupação acrescida, por parte dos consumidores, em adquirir produtos ricos em compostos com propriedades antioxidantes, benéficos para a saúde. A casca de romã pode originar extratos ricos em compostos bioativos acima descritos que possam ser incorporados em alimentos e desse modo enquadrar-se nas exigências dos consumidores. Para além disso, a casca é um subproduto existente em grande quantidade que é desperdiçado da indústria de bebidas elaboradas à base de romã, que de um modo geral, não é utilizada para outros fins. Até ao momento, há pouca informação disponível sobre a bioatividade de cascas de romãs cultivadas em Espanha, tendo a maioria dos estudos incidido em sumos das três principais cultivares, nomeadamente: Mollar de Elche, Valenciana e Wonderful (Mena et al. 2011). Nesse sentido, e de forma a contribuir para a valorização deste subproduto, o presente estudo teve como objetivo principal determinar a presença de taninos hidrolisáveis e de flavonóides, bem como a atividade antioxidante da casca de nove cultivares produzidas em Espanha.

Material e Métodos

Amostragem

As romãs estudadas neste trabalho foram colhidas em Valência, Espanha, tendo sido seleccionadas nove cultivares, nomeadamente: Mollar de Elche, Valenciana, White, CG8, Cis 127, Parfianka, Katirbasi, Wonderful 1 e Wonderful 2 (fig. 1). Após a colheita, os frutos foram transportados para o laboratório sob refrigeração. À sua chegada, foram lavados com água ultra-pura (sistema Milli-Q) e as cascas foram separadas dos restantes constituintes da romã.

Características físicas

Nas nove cultivares de romã foram avaliados os seguintes parâmetros: massa do fruto, massas e percentagens da casca, e cor. A cor da casca foi avaliada com um colorímetro Minolta CR-400, no modo CIELab, avaliando-se as coordenadas L^* , a^* , b^* .

Preparação dos extratos

Os extratos preparados a partir da casca de romã foram obtidos seguindo a metodologia descrita por Bchir et al. (2012). Aproximadamente 1 g de casca triturada foi misturada com 20 mL de solução de metanol: água (4:1, v/v) à temperatura ambiente, durante 5 h, sob agitação (IKA, RCT Modelo B). Em seguida, os extratos foram filtrados, congelados, liofilizados e re-

dissolvidos a 50 mg mL⁻¹ aquando da avaliação das propriedades químicas a seguir descritas. Todas as extrações foram realizadas em triplicado.

Flavonóides

O teor em flavonóides totais foi determinado segundo o método descrito por Viuda-Martos et al. (2011), com ligeiras alterações. Aos extratos de casca de romã foram adicionados 0,3 mL de NaNO₂ (5%, m/v) e, após 5 min, 0,3 mL de AlCl₃ (10%, m/v). Após 6 minutos, adicionaram-se 2 mL de NaOH (1M). A absorvância foi lida a 510 nm e os flavonóides totais foram quantificados usando uma curva padrão de quercetina (10-160 µg mL⁻¹). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de quercetina por g de extrato de casca (mg QE g⁻¹ de extrato).

Taninos Hidrolisáveis

O teor em taninos hidrolisáveis foi determinado pelo método descrito por Elfalleh et al. (2012). A 1 mL da solução de extrato das cascas de romã, adicionaram-se 5 mL de 2,5% KIO₃ e misturou-se a solução no vórtex durante 10 segundos. Mediu-se a absorvância das soluções a 550 nm, tendo o branco sido preparado com uma solução metanol:água (4:1,v/v), igual à usada na preparação dos extratos. Diferentes concentrações de soluções de ácido tânico (0,025 a 0,8 g L⁻¹) foram utilizadas para a curva de calibração. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido tânico por g de extrato (mg TAE g⁻¹ extrato).

Atividade antioxidante

Capacidade Redutora Total:

A Capacidade Redutora Total (CRT) da casca de romãs foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu. A 100 µL das soluções de extratos com diferentes concentrações, foram adicionados 7,90 mL de água desionizada e 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 a 8 minutos foi adicionado 1,5 mL de uma solução saturada de carbonato de sódio. Aguardaram-se 2 horas e fez-se a leitura da absorvância a 765 nm. A curva de calibração foi preparada com ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por g extrato (mg GAE g⁻¹ extrato).

Efeito Bloqueador dos Radicais Livres de DPPH

A 300 µL de soluções de diferentes concentrações de extratos de casca foi adicionada 2,7 mL de solução metanólica de DPPH. Depois de 1 hora, no escuro, à temperatura ambiente, a absorvância foi lida a 517 nm. A atividade antioxidante foi expressa pela percentagem de Efeito Bloqueador dos Radicais Livres de DPPH de acordo com a Equação 1. O branco foi feito com metanol.

$$\text{Efeito Bloqueador dos Radicais Livres de DPPH}(\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{amostra}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (1)$$

, sendo A_{DPPH} a absorvância da solução metanólica de DPPH (sem amostra) e A_{amostra} a absorvância da solução com amostra.

Poder Redutor:

A 1,0 mL de soluções de extrato de casca de romã a diferentes concentrações, foram adicionados 2,5 mL de solução tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL de K₃[Fe(CN)₆] 1% (m/v). Após agitação, a mistura foi incubada a 50 °C durante 20 minutos e posteriormente foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (m/v). 2,5 mL da mistura foram transferidos para outro tubo de ensaio, aos quais foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de FeCl₃ a 0,1% (m/v). A absorvância foi lida a 700 nm.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada no software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL), versão 18.0. A normalidade e a homogeneidade da variância foram verificadas pelos testes Shapiro-Wilk e Levene, respetivamente. Uma vez que se observou homogeneidade de variâncias e de modo a avaliar a existência de diferenças significativas entre os extratos preparados a partir de cascas de diferentes cultivares de romã aplicou-se a One-Way ANOVA. Aquando da existência de diferenças significativas aplicou-se o teste post-hoc de Tukey HSD para determinar as cultivares diferentes entre si.

Resultados e Discussão

Características físicas

Verificou-se que as nove cultivares estudadas apresentaram diferenças nas percentagens de casca, variando entre 36,18 a 57,74% para a Parfianka e Cis 127, respetivamente (quadro 1). Quanto à cor também se verificaram diferenças significativas entre as cascas das cultivares. O parâmetro L^* (luminosidade) apresentou os valores mais elevados nas cultivares Mollar de Elche e Valenciana. Este facto era esperado, uma vez que foram as que apresentaram a casca mais clara (fig. 1). Pelo contrário, as cultivares White, Parfianka e CG8 foram aquelas que apresentaram os menores valores de L^* , sendo as cultivares mais escuras. Quanto aos parâmetros a^* (verde-vermelho⁺) e b^* (azul-amarelo⁺), a cultivar White foi a que apresentou os menores valores para ambos os componentes. Segundo o parâmetro a^* , as cultivares Cis 127 e Valenciana foram as mais avermelhadas, enquanto pelo parâmetro b^* , a Mollar de Elche e a Valenciana foram as mais amareladas.

Flavonóides e taninos hidrolisáveis

As cascas das nove cultivares apresentaram diferenças significativas no teor de flavonóides e taninos hidrolisáveis, tendo a cultivar Valenciana se destacado com os maiores valores em flavonóides (546 mg QE g⁻¹ extrato) e taninos (2109 mg TAE g⁻¹ extrato). No entanto, a Mollar de Elche e a Cis 127 também apresentaram valores elevados desses compostos bioativos. Pelo contrário, as cascas das cultivares Katirbasi e Parfianka foram as que apresentaram os menores valores de flavonóides e taninos, respetivamente.

Atividade antioxidante

Capacidade Redutora Total:

A CRT nas cascas de romã variou entre 243,7 e 1509,9 mg GAE g⁻¹ de extrato (quadro 2). Nesse sentido, as cascas das romãs apresentaram valores muito distintos entre cultivares, tendo a cultivar Valenciana sido aquela que apresentou os maiores valores de CRT. Refira-se que esta cultivar foi a que apresentou os maiores valores de flavonóides e taninos hidrolisáveis, classes incluídas nos compostos fenólicos (Balasundram et al. 2006).

Efeito Bloqueador dos Radicais Livres de DPPH:

O Efeito Bloqueador dos Radicais Livres de DPPH apresentou diferenças significativas entre as cascas das diferentes cultivares, tendo o valor de EC₅₀ variado entre 6,93 e 58,72 mg L⁻¹, para a Valenciana e Katirbasi, respetivamente (quadro 2). Nesse sentido, a cultivar Valenciana, seguida da Cis 127, apresentaram o maior potencial antioxidante, uma vez que os valores de EC₅₀ foram os mais baixos. Ao comparar estes resultados com os de Elfalleh et al. (2012), os quais testaram diferentes solventes de extração, valores semelhantes ao nosso limite inferior foram obtidos, nomeadamente iguais a 3,88 e 11,48 mg L⁻¹ para metanol e água, respetivamente.

Poder Redutor:

Também no Poder Redutor, as cascas de romã apresentaram diferenças significativas entre cultivares. As cultivares Valenciana, Cis 127, Mollar de Elche e Wonderful 1 foram as que apresentaram os menores valores de EC₅₀ em comparação com as restantes cultivares. Assim, a Valenciana, Cis 127, Mollar de Elche e Wonderful 1 foram as que apresentaram maior atividade antioxidante.

Conclusões

Em suma, a cultivar Valenciana foi a que apresentou a casca com maior potencial antioxidante, resultado dos maiores teores de flavonóides, taninos hidrolisáveis, Capacidade Redutora Total, Efeito Bloqueador de Radicais Livres de DPPH e Poder Redutor. No entanto, cascas de outras cultivares mostraram também ter potencial antioxidante, nomeadamente a Cis 127, Wonderful 1 e Mollar de Elche. Nesse sentido, o presente trabalho demonstrou que as cascas de cultivares de romã podem ser reutilizadas e os seus extratos incorporados em outros produtos alimentares, tendo em conta os compostos detetados, os quais que são referidos na literatura como tendo efeitos positivos na saúde humana.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao POCTEP - Programa Cooperação Transfronteiriça Espanha-Portugal pelo apoio financeiro através do Projeto "RED/AGROTEC - Red transfronteriza España Portugal de experimentación y transferencia para el desarrollo del sector agropecuario y agroindustrial".

Referências

- Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99:191-203.
- Bchir, B., Besbes, S., Karoui, R., Attia, H., Paquot, M. & Blecker, C. 2012. Effect of air-drying conditions on physico-chemical properties of osmotically pre-treated pomegranate seeds. *Food and Bioprocess Technology* 5:1840–1852.
- Caliskan, O. & Bayait, S. 2012. Phytochemical and antioxidant attributes of autochthonous Turkish pomegranates. *Scientia Horticulturae* 147:81-88.
- Elfalleh, W., Hannachi, H., Tlili, N., Yahia, Y., Nasri, N. & Ferchichi, A. 2012. Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research* 6:4724-4730.
- Fawole, O.A., Makunga, N.P. & Opara, L. 2012. Antibacterial, Antioxidant and Tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit skin methanolic extract. *BMC Complementary & Alternative Medicine* 12:2-12.
- Ismail, T., Sestili, P. & Akhtar, S. 2012. Pomegranate skin and fruit extracts: A review of potencial anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology* 143:397-405.
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D.A., Bartual, J., Saura, D. & Martí, N. 2011. Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91:1893-1906.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E. & Pérez-Álvarez, J.A. 2011. Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International* 44:1217–1223.

Quadro 1 – Características físicas das nove cultivares de romã estudadas no presente trabalho

Cultivares	Massa do fruto (g)	Massa da casca (g)	% casca	Cor da casca		
				L*	a*	b*
Mollar de Elche	478,64±13,54 ^a	197,59±11,79 ^a	41,33±3,28 ^{a,b}	62,59±10,35 ^a	23,89±14,66 ^a	34,08±4,61 ^a
Valenciana	438,05±49,49 ^{a,b}	178,36±18,47 ^{a,b}	40,75±0,44 ^{a,b}	48,69±7,61 ^b	43,23±6,22 ^{b,c}	26,93±2,90 ^b
White	175,95±28,81 ^c	78,27±16,32 ^c	44,54±7,27 ^{a,b,c}	28,12±1,62 ^c	13,90±6,83 ^d	3,20±2,01 ^c
CG8	335,72±8,50 ^{a,b}	161,79±25,58 ^{a,b}	48,11±6,63 ^{b,c}	34,05±4,24 ^{d,e}	34,09±4,77 ^{a,e}	13,00±3,19 ^d
Cis 127	324,62±50,43 ^{a,b}	186,06±22,01 ^{a,b}	57,74±5,80 ^c	46,80±6,47 ^b	45,16±6,25 ^b	26,00±2,74 ^b
Katirbasi	275,10±32,68 ^{b,c}	118,79±10,48 ^{b,c}	43,30±2,01 ^{a,b,c}	36,21±5,12 ^{e,f}	41,24±4,01 ^c	17,38±3,75 ^e
Parfianka	412,46±84,63 ^{a,b}	148,25±22,54 ^{a,b,c}	36,18±1,77 ^a	33,67±2,43 ^d	35,26±5,17 ^{e,f}	13,63±3,62 ^d
Wonderful 1	368,55±25,00 ^b	168,89±29,21 ^{a,b}	45,61±4,94 ^{a,b,c}	40,20±6,74 ^g	38,45±5,60 ^f	17,53±5,38 ^c
Wonderful 2	415,17±39,36 ^{a,b}	180,32±48,62 ^{a,b}	42,95±8,16 ^{a,b}	37,13±3,97 ^f	36,62±6,69 ^f	14,11±3,75 ^d

Os valores na mesma coluna com diferentes letras são estatisticamente diferentes (p<0,05). (média ± desvio-padrão, n=4).

Quadro 2 - Flavonóides, taninos hidrolisáveis e atividade antioxidante da casca de nove cultivares de romã cultivadas em Espanha.

Cultivares	Flavonóides (mg QE g ⁻¹ extrato)	Taninos hidrolisáveis (mg TAE g ⁻¹ extrato)	CRT (mg GAE g ⁻¹ extrato)	EC ₅₀ DPPH* (mg L ⁻¹)	EC ₅₀ Poder Redutor** (mg L ⁻¹)
Mollar de Elche	303±48 ^a	727±163 ^{a,b}	570,5±18,3 ^{b,d}	17,85±7,99 ^a	59,80±2,35
Valenciana	546±78 ^b	2109±230 ^c	1509,9±305,7 ^c	6,93±0,19 ^a	41,77±11,45
White	228±26 ^c	383±82 ^{d,e}	471,3±35,8 ^{a,d,e}	13,21±0,33 ^a	205,72±276,77
CG8	137±8 ^d	265±42 ^d	243,7±8,7 ^d	29,85±1,14 ^b	334,50±201,15
Cis 127	325±16 ^a	893±136 ^b	976,5±154,0 ^f	12,43±0,82 ^a	57,71±1,29
Katirbasi	102±12 ^d	259±56 ^d	257,9±23,1 ^d	58,72±16,58 ^d	317,41±106,11
Parfianka	150±17 ^d	184±62 ^d	336,0±87,6 ^{a,d,e}	50,56±0,87 ^c	202,27±58,79
Wonderful1	230±24 ^c	541±87 ^{a,e}	741,7±105,3 ^{b,f}	16,97±0,45 ^a	59,59±0,03
Wonderful 2	161±19 ^d	357±47 ^{d,e}	324,6±31,0 ^{d,e}	30,90±2,93 ^b	280,60±134,71

Os valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p<0,05). (média ± desvio-padrão, n=3). QE - equivalentes de quercetina. TAE - equivalentes de ácido tânico. GAE – equivalentes de ácido gálico. *EC₅₀ DPPH - Concentração de extrato que origina um Efeito Bloqueador do Radical Livre de DPPH igual a 50%. **EC₅₀ Poder Redutor - Concentração de extrato necessária para se obter uma absorvância de 0,5 no ensaio do Poder Redutor.

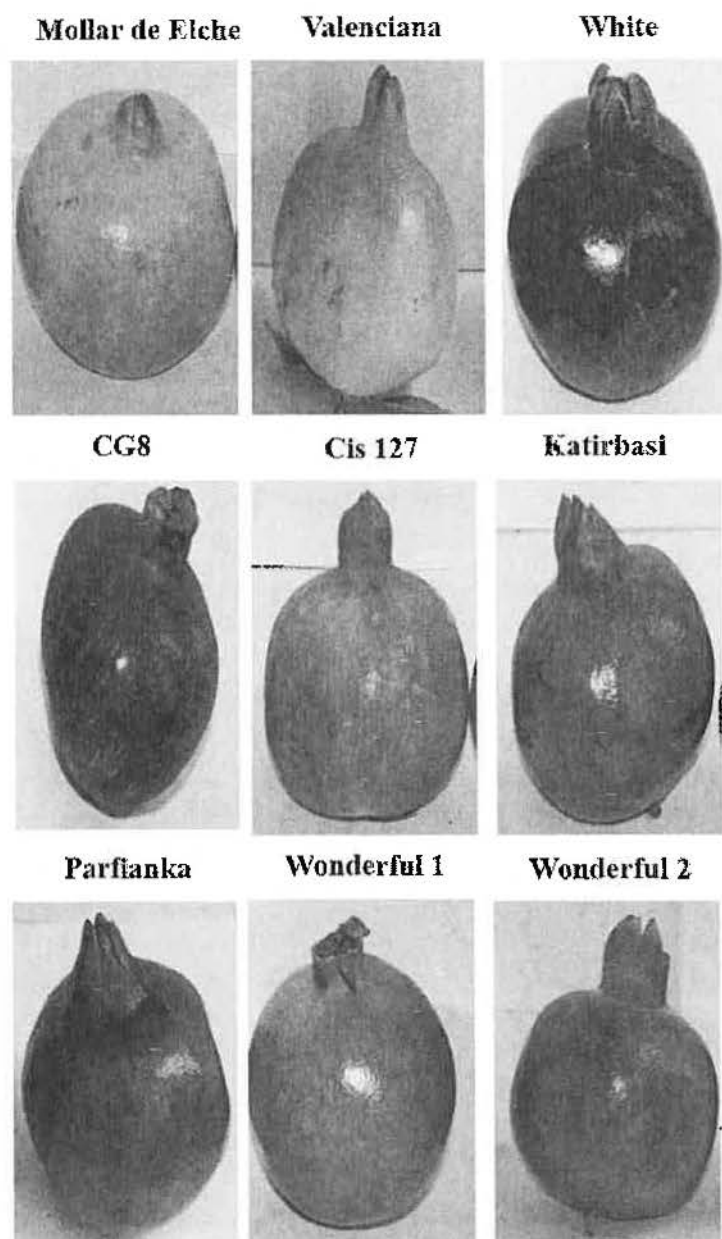


Figura 1 - Cultivares de romã estudadas no presente trabalho.