

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas



Pesquisa da atividade antioxidante em subprodutos alimentares:  
conceito de sustentabilidade

Daniela Margarida Carvalho Valente

Porto, 2015



Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas



Pesquisa da atividade antioxidante em subprodutos alimentares:  
conceito de sustentabilidade

Daniela Margarida Carvalho Valente

Porto, 2015

**Trabalhos desenvolvidos durante a execução desta dissertação:**

**Daniela M. C. Valente**, Carla Sousa, Ana F. Vinha. Natural resources of phytochemical constituents in citrus fruits wastes. Poster n. 13 *In*: XIV Congresso de Nutrição e Alimentação. Dias 21 e 22 de maio de 2015. Lisboa, Portugal.

Pesquisa da atividade antioxidante em subprodutos alimentares:  
conceito de sustentabilidade



---

(Daniela Margarida Carvalho Valente)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. Doutora Ana Cristina Mendes Ferreira da Vinha.

## RESUMO

As indústrias agroalimentares produzem anualmente grandes quantidades de resíduos cuja valorização é ainda muito pequena. Atualmente sabe-se que apenas uma pequena parte é reaproveitada para a alimentação direta de gado ou para compostagem. A estratégia de implementar uma gestão de resíduos exequíveis, além de valorizar fortemente um subproduto, diminui consideravelmente a carga poluente resultante da atividade agroindustrial e potencia o sistema agrícola e económico de um país.

A baixa ingestão de fibras, vitaminas e minerais é um hábito corrente na população mundial. Para aumentar o consumo desses nutrientes, várias alternativas têm sido propostas, dentre as quais a produção de novos géneros alimentícios enriquecidos com subprodutos alimentares, que possuam um valor nutricional superior ao alimento original, mas que sejam, ao mesmo tempo, acessíveis às classes economicamente menos favorecidas. Uma alternativa para esse problema é o recurso de novos ingredientes que possam aumentar o aporte nutricional comparativamente com os alimentos tradicionais já comercializados no mercado corrente. Com o intuito de valorizar os resíduos alimentares e provar que os mesmos apresentam propriedades biológicas idênticas às já descritas nas polpas das frutas cítricas, neste trabalho foi integrado um estudo baseado no desenvolvimento de um novo biscoito enriquecido com as cascas dos frutos cítricos estudados. Para isso, foram quantificados os teores de alguns compostos bioativos e a respetiva atividade antioxidante nas cascas e nas polpas de seis citrinos diferentes, de origem Portuguesa, nomeadamente a laranja (*Citrus sinensis*), o limão (*Citrus limon*), a clementina (*Citrus clementina*), a toranja (*Citrus paradisi*), a tangerina (*Citrus reticulata*) e a lima (*Citrus aurantifolia*).

Determinou-se o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e carotenoides recorrendo a métodos espectrofotométricos previamente validados. A atividade antioxidante foi estudada através do método colorimétrico de inibição do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH<sup>\*</sup>).

Este trabalho teve como objetivo adicional elaborar um novo biscoito enriquecido com cascas de citrinos pouco aproveitados ou normalmente subutilizados e caracterizá-los sensorialmente, recorrendo a um painel de 150 provadores não treinados, de forma monádica sequencial, usando uma escala de pontuação de Likert com 9 categorias, de extremamente agradável a extremamente desagradável. As amostras foram também avaliadas em relação à intenção de compra por parte dos consumidores, visando um futuro recurso de sustentabilidade e aumento de aporte nutricional.

**Palavras-chave:** Sustentabilidade; Subprodutos; Compostos bioativos; Atividade antioxidante; Alimento enriquecido; Análise sensorial.

## ABSTRACT

The agro-food industries annually produce large quantities of waste which valorization is still very small. Currently it is known that only a small part is reused for cattle feed or used for composting. The strategy to implement a feasible waste management, and also enrich the food by-products, considerably reduces the pollutant load resulting from agro-industrial activity, enhances agricultural and economic system of a country.

The low intake of fiber, vitamins and minerals is a common habit in the world population. To increase consumption of these nutrients, several alternatives have been proposed, among which the production of novel fortified foods, which may have higher nutritional value than the original food, but also at the same time, to be accessible to less economically favored classes. An alternative to this problem is to use new ingredients that can increase the nutritional intake compared to traditional foods already in the current market. In order to enhance food waste and also to prove that they have identical biological properties to those already described in the citrus fruit pulps, this work has been integrated into a study based on the development of a new biscuit enriched with the peels of six citrus fruits. For this reason, the content of some bioactive compounds and their antioxidant activity were analyzed in the peel and in the pulp of six different Portuguese citrus fruits, namely, orange (*Citrus sinensis*), lemon (*Citrus limon*), clementine (*Citrus clementine*), grapefruit (*Citrus paradisi*), tangerine (*Citrus reticulata*) and lime (*Citrus aurantifolia*).

It was determined the content of total phenolics, flavonoids and carotenoids by using spectrophotometric methods, previously validated. The antioxidant activity was also studied using a colorimetric method, the free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) assay.

In this work we elaborated a new enriched biscuit with citrus peel, by assessing them through a sensory analysis, using a panel of 150 untrained, following a sequential monadic manner, and using a Likert scoring scale with 9 categories: extremely pleasant to extremely unpleasant. The samples were also evaluated for purchase intent among consumers, aiming a future resource sustainability and increased nutrient intake.

**Keywords:** Sustainability; By-products; Bioactive compounds; Antioxidant activity; Enriched food; Sensory analysis.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao concluirmos uma etapa é necessário agradecer aqueles que estiverem ao nosso lado, pois, sem apoio, nada somos.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Cristina Vinha, pela constante disponibilidade, simpatia, motivação, recomendações, correções, empenho, incentivo e pelos conhecimentos que partilhou comigo, o meu profundo agradecimento.

Agradeço igualmente à minha co-coordenadora Professora Doutora Carla Sousa e Silva pelo apoio e tempo disponibilizado para me auxiliar no laboratório e à Professora Doutora Conceição Manso pela disponibilidade e atenção prestados no decorrer da análise estatística.

À Universidade Fernando Pessoa pela possibilidade de realizar este mestrado.

Por fim, gostaria de uma forma muito especial expressar o meu mais sincero agradecimento à minha família, amigos e namorado por todo o amor, amizade, paciência, preocupação diária e apoio incondicional.

## ÍNDICE

<b>RESUMO .....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>x</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Sustentabilidade .....	3
2.2. Subprodutos agroalimentares .....	4
2.3. Frutos cítricos .....	5
2.3.1. Laranja.....	8
2.3.2. Limão .....	9
2.3.3. Lima .....	9
2.3.4. Toranja .....	10
2.3.5. Mandarinas .....	11
2.4. Antioxidantes nos frutos.....	12
2.4.1. Antioxidantes majoritários nos citrinos.....	14
2.5. Aplicação dos subprodutos dos citrinos .....	17
<b>CAPÍTULO III. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
3.1. Objetivo geral.....	18

3.2. Objetivos específicos.....	18
<b>CAPÍTULO IV. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
4.1. Amostras.....	19
4.2. Compostos bioativos e atividade antioxidante .....	19
4.2.1. Preparação dos extratos .....	19
4.2.2. Determinação de compostos fenólicos totais .....	19
4.2.3. Determinação dos flavonoides totais.....	20
4.2.4. Determinação dos carotenoides.....	20
4.3. Atividade antioxidante .....	21
4.3.1. Inibição do radical livre DPPH <sup>•</sup> .....	21
4.4. Análise sensorial .....	22
4.5. Análise estatística.....	23
<b>CAPITULO V. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
5.1. Solvente Extrator.....	24
5.2. Análise dos compostos bioativos .....	25
5.3. Atividade antioxidante .....	31
5.4. Análise sensorial .....	34
<b>CAPITULO VI. CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>45</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-Anatomia dos citrinos.....	7
Figura 2-Laranja.....	8
Figura 3-Limão.....	9
Figura 4-Lima.....	9
Figura 5-Toranja.....	10
Figura 6-Tangerina.....	11
Figura 7-Clementina.....	11
Figura 8-Fenólicos totais (mg EAG/ g) das cascas dos citrinos.....	26
Figura 9-Fenólicos totais (mg EAG/ g) das polpas dos citrinos .....	26
Figura 10-Correlação de Pearson obtida entre a atividade antioxidante e o teor de fenólicos totais .....	27
Figura 11-Flavonoides totais (mg EC/ g) das cascas dos citrinos.....	28
Figura 12-Flavonoides totais (mg EC/ g) das polpas dos citrinos.....	28
Figura 13-Correlação de Pearson obtida entre a atividade antioxidante e o teor de flavonoides totais .....	29
Figura 14-Atividade antioxidante das cascas dos citrinos .....	32
Figura 15-Atividade antioxidante das polpas dos citrinos .....	32
Figura 16-Percentagem dos teores de fenólicos totais e de flavonoides desperdiçados aquando do não reaproveitamento das cascas dos citrinos estudados .....	34
Figura 17-Percentagem de participantes relativamente ao género.....	36

Figura 18-Percentagem de participantes da análise sensorial do sexo feminino e masculino de acordo com a sua faixa etária .....	37
Figura 19-Diagrama teia de aranha relativo às médias da avaliação da aparência de acordo com sexo e faixa etária .....	38
Figura 20-Diagrama teia de aranha relativo às médias da avaliação do aroma de acordo com sexo e faixa etária .....	39
Figura 21-Diagrama teia de aranha relativo às médias da avaliação do sabor de acordo com sexo e faixa etária .....	40
Figura 22-Diagrama teia de aranha relativo às médias da avaliação da aparência, aroma e sabor .....	41
Figura 23-Diagrama de barras relativo a valores de intenção de compra (%) de cada biscoito, por faixa etária.....	42
Figura 24-Diagrama de barras relativo a valores de intenção de compra (%) de cada biscoito. Barras de erro representam o intervalo de confiança a 95% (com correção de Bonferroni). ..	43

## **ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1-Teor de carotenoides ( $\mu\text{g/ g}$ ) obtidos nas cascas e polpas dos citrinos estudados .... 30

## **CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO**

A alimentação exerce um papel importante na promoção e manutenção da saúde humana. As frutas constituem uma parte integrante da dieta atual, inserindo-se no padrão alimentar da dieta mediterrânica, a qual foi recentemente reconhecida pela UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura) como património Cultural Imaterial da Humanidade (Comissão Nacional da UNESCO, 2013).

O crescente interesse dos consumidores por produtos mais saudáveis como frutas e vegetais reflete as evidências de vários estudos científicos os quais defendem que o consumo destes alimentos acarretam efeitos benéficos para a saúde, nomeadamente na prevenção de doenças crónicas, tais como, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e cancro (Balogh *et al.*, 2010; Mohammadian *et al.*, 2011; Bermejo e Cano, 2012; Parashar *et al.*, 2014).

A indústria de processamento de alimentos e agro-alimentar produz uma grande quantidade de resíduos ou subprodutos como cascas, sementes e polpas danificadas, os quais representam 50% da matéria-prima das frutas processadas (Vasudeva e Sharma, 2012). A procura de recursos naturais baratos, ricos em compostos antioxidantes tem atraído o interesse por parte da comunidade científica, profissionais de saúde e pelos próprios consumidores. Por esse motivo, muitos estudos têm sido desenvolvidos de forma a seleccionar matérias-primas, incluindo os resíduos agroindustriais, com o intuito da sua recuperação e possível reutilização nas áreas alimentares, farmacêutica e cosmética (Yasoubi *et al.*, 2007).

Face ao crescente desperdício de alimentos e subprodutos provenientes da indústria torna-se necessário adotar medidas para a prática do consumo consciente pela população em relação à alimentação. O aproveitamento integral de frutas e hortaliças (polpa, cascas, talos e folhas), na elaboração de novos produtos, é uma alternativa tecnológica limpa que está ao alcance de todos, pois pode ser aplicada tanto no ambiente industrial como residencial. A utilização do alimento, de forma sustentável, reduz a produção de lixo orgânico, prolonga a vida útil do alimento e promove a segurança alimentar.

Com o intuito de eliminar/reduzir os níveis de subprodutos formados pelas indústrias alimentares, concretamente, as de frutas e derivados, o presente trabalho teve por

objetivo reaproveitar as cascas de 6 citrinos nacionais (laranja, limão, lima, clementina, tangerina e toranja) numa proposta de desenvolvimento de um produto alimentar. A formulação do produto (biscoito com cascas de citrinos) foi padronizada e as características químicas de cada casca foram igualmente analisadas. Foram quantificados os teores de fenólicos totais, flavonoides e carotenoides por técnicas espectrofotométricas. A atividade antioxidante de cada subproduto foi obtida pelo método do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>). Tendo em consideração o grau de aceitabilidade deste produto por parte dos consumidores, foi igualmente realizado uma análise sensorial aos seis biscoitos enriquecidos com as cascas dos citrinos supracitados.

## **CAPÍTULO II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Sustentabilidade**

A definição de sustentabilidade mais difundida é a da Comissão Brundtland, a qual considera que o desenvolvimento sustentável deve satisfazer as necessidades da geração presente sem comprometer as necessidades das gerações futuras. Esta definição deixa claro um dos princípios básicos de sustentabilidade, a visão de longo prazo, uma vez que os interesses das futuras gerações devem ser analisados. Existem atualmente diversas definições de desenvolvimento sustentável, sendo que a maioria dos estudos afirma que este conceito envolve três dimensões que se relacionam: econômica, ambiental e social (Claro *et al.*, 2008).

O conceito de desenvolvimento sustentável disseminou-se por diversos setores da economia e a consciência da sociedade sobre a importância da preservação ambiental para a manutenção da qualidade de vida é cada vez maior. Questões como a conservação da biodiversidade, a recuperação dos ambientes degradados e a adoção de políticas públicas que garantam o desenvolvimento sustentável saíram do ambiente acadêmico e passaram a ser debatidos pela sociedade. Esta passou a sentir as consequências dos impactos das atividades antrópicas sobre o meio ambiente, o que levou a uma maior aceitação da necessidade de mudança no atual modelo de desenvolvimento. Passou-se a ter noção de que os recursos existentes no nosso planeta são finitos e há necessidade de se realizar o tratamento dos resíduos formados (Freitas, 2008; Lacerda e Cândido, 2013).

Os relatórios da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) revelam que 37 países a nível mundial estão a precisar de assistência externa por alimentos, sendo 29 desses países africanos (FAO, 2015). As recentes crises alimentares têm aumentado a consciência do consumidor relativamente ao impacto na saúde pública da produção de alimentos, do seu processamento e da sua distribuição (Wognum *et al.*, 2011). Verifica-se igualmente a intensificação da sensibilização do consumidor perante o uso pouco adequado das matérias-primas e respetivos resíduos (Falguera *et al.*, 2012). Hoje em dia, está a tornar-se comum ter em conta a qualidade, a segurança e a conformidade ambiental nas decisões de aquisição dos produtos. Em contrapartida, cabe aos produtores responder a estes requisitos, aumentando a sustentabilidade dos processos e produtos (Wognum *et al.*, 2011).

Prevê-se que até 2050, as necessidades alimentares mundiais venham a aumentar significativamente devido ao aumento da população mundial e também devido à melhor e maior ingestão alimentar (Spiertz, 2010). Tendo em consideração o aumento da população, a escassez de alimentos e, conseqüentemente, a dificuldade em fornecer alimento para todos, a indústria agro-alimentar é uma das principais visadas quando se aborda sobre sustentabilidade. Assim, as indústrias agro-alimentares enfrentam vários desafios, nomeadamente a gestão dos subprodutos que a sua atividade produz. Esta problemática tem de ser vista na perspectiva da sustentabilidade e, assim, também ao nível da sociedade, economia e ambiente.

## **2.2. Subprodutos agroalimentares**

Atualmente, grandes quantidades de resíduos sólidos e líquidos são produzidos anualmente pela indústria de processamento de produtos alimentares. Estes materiais contêm resíduos biodegradáveis principalmente matéria orgânica e sua eliminação cria graves problemas ambientais (Schieber *et al.*, 2001; Makris *et al.*, 2007). No entanto, estes subprodutos são também fontes promissoras de compostos bioativos que podem ser reutilizados, atendendo às suas propriedades biológicas (Schieber *et al.*, 2001).

A quantidade de resíduos produzidos pode ser significativamente reduzida através do recurso a novos métodos de processamento ou da modificação dos já existentes, ou através do tratamento e reutilização dos mesmos. Para este fim, estão a ser desenvolvidos diferentes processos que visam a conversão dos resíduos em biocombustíveis, ingredientes alimentares ou outros produtos biológicos (Makris *et al.*, 2007).

Até à data corrente muitos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito da obtenção de compostos bioativos a partir de subprodutos alimentares, tal como a casca e pele da avelã (Contini *et al.*, 2008; Alasalvar *et al.*, 2009; Locatelli *et al.*, 2010), casca de amêndoa (Pinelo *et al.*, 2004) e casca de pistáchio (Goli *et al.*, 2005; Tomaino *et al.*, 2010). Os subprodutos da indústria do azeite também têm atraído considerável atenção por parte da comunidade científica (Balasundram *et al.*, 2006). A utilização das águas ruças nos sistemas de rega dos solos agrícolas, a utilização dos caroços da azeitona na produção de energia calorífica (Pinto, 2003) e o aproveitamento das folhas de oliveira

devido à presença de antioxidantes fenólicos de interesse (Pereira *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2010) são alguns exemplos práticos. As cascas de vários frutos foram também alvo de estudos, como é o caso das cascas de maçãs, pêssegos e pêras cujas cascas contêm o dobro de compostos fenólicos totais relativamente às polpas dos mesmos (Balasundram *et al.*, 2006). Outros subprodutos igualmente importantes são as cascas, sementes e polpa dos citrinos. As indústrias de processamento de sumos utilizam especialmente as polpas das frutas cítricas e as suas cascas constituem o principal resíduo. Geralmente, estas indústrias secam os resíduos e vendem-nos para extração de pectina ou para ração animal, contudo nenhum destes processos é muito rentável. Estes subprodutos têm também sido tradicionalmente utilizados na produção de combustível (Mamma *et al.*, 2008; Casquete *et al.*, 2015). As cascas secas de frutos cítricos são uma fonte de pectina, celulose e hemicelulose e podem ser utilizadas como substrato de fermentação. Sendo uma das utilizações deste subproduto a produção de preparações multienzimáticas, que contêm enzimas pectinolíticas e celulolíticas através de fungos mesofílicos (Mamma *et al.*, 2008).

Pelas razões referidas, existe um grande interesse na criação de produtos alimentares a partir de materiais residuais, sendo que os resíduos dos citrinos não são uma exceção (Abirami e Nirmala, 2013). A possibilidade de exploração destes desperdícios naturais conferem segurança alimentar e são vantajosos do ponto de vista económico, para além da sua riqueza em compostos bioativos cuja reutilização converge para uma utilidade terapêutica (Gnanasaraswathi *et al.*, 2014).

### **2.3. Frutos cítricos**

A maioria dos taxonomistas considera *Citrus* um género de plantas pertencente à família Rutaceae (Madhuri *et al.*, 2014), subfamília Aurantioideae e ordem Geraniales (Nicolosi, 2007). O género *Citrus*, onde se incluem praticamente todas as árvores cítricas cultivadas no mundo, constitui o principal género desta subfamília. Este género apresenta um grande número de variedades devido a mutações espontâneas, bem como à elevada ocorrência de híbridos naturais, juntamente com o elevado número de híbridos interespecíficos obtidos artificialmente. Estas variedades, algumas com maior ou menor

valor comercial, receberam nomes locais, o que complica a identificação taxonómica de cada uma delas (Ortiz, 2002).

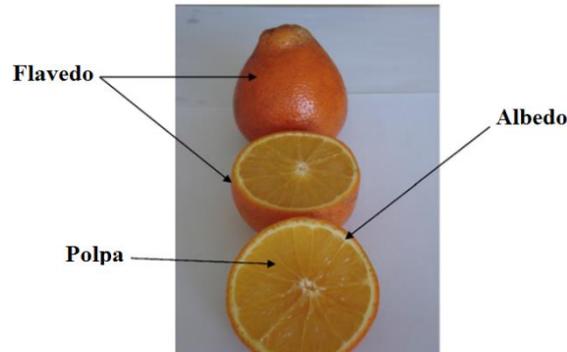
Os citrinos são originários do continente asiático (China e Índia) tendo-se adaptado bem em muitas zonas do mundo, entre as quais se destacam a bacia do Mediterrâneo, grande parte do continente americano e ainda a Sul do continente africano.

Portugal, devido à sua dimensão, tem um peso modesto na citricultura mundial, a nível de volume de produção. No entanto, num contexto nacional, os citrinos constituem, juntamente com as pomóideas (macieira e pereira) e a vinha, um dos três principais grupos de culturas produtoras de frutos. Em contrapartida, o nosso país teve um papel relevante na história da citricultura. Apesar de não se poder afirmar com certeza que foram os portugueses a introduzir a laranja doce no hemisfério ocidental, é evidente que foram os nossos navegadores que trouxeram as melhores variedades de laranja para a Europa. Ainda que antes da descoberta do caminho marítimo para a Índia, já se cultivavam alguns citrinos no sul da Europa e no norte de África, foi desde o início do séc. XVI que a cultura destes frutos, principalmente da laranja doce, atingiu elevada importância em Portugal e nos países vizinhos. Os citrinos encontram-se espalhados pelo nosso país, nos quintais e hortas, mas a produção de laranjas e tangerinas numa escala comercial está limitada ao Algarve, ao litoral alentejano e a algumas zonas microclimáticas. O limoeiro tem, além dessas localizações, uma importante zona de produção na região Oeste (Duarte, 2012).

Ao longo dos séculos, a expansão dos citrinos pelo mundo foi grande, sendo hoje cultivados nos cinco continentes, em condições e ecossistemas completamente variados, com expressões muito características por regiões ou países em relação às espécies mais significativas. As diferentes condições edafoclimáticas das regiões produtoras fazem com que os citrinos daí obtidos, ainda que das mesmas variedades ou cultivares, possuam características diferentes, tanto a nível nutricional, químico e organoléptico (Bermejo e Cano, 2012).

Os citrinos são formados pela casca que se subdivide em epicarpo ou flavedo e em mesocarpo ou albedo, e pelo endocarpo ou polpa (material interno) (Ramful *et al.*, 2010; Chede, 2013). O flavedo representa a superfície exterior pigmentada da casca (Ramful *et al.*, 2010) e desempenha a função primária de proteção da fruta face às condições edafoclimáticas (Mohammadian *et al.*, 2011), enquanto o albedo compreende a camada

central da casca, apresentando cor branca e textura suave (Ramful *et al.*, 2010) (Figura 1).



**Figura 1**-Anatomia dos citrinos (Adaptado de Ramful *et al.*, 2010).

A citricultura é um dos setores mais competitivos e de maior potencial de crescimento agroeconómico, integrando-se nos diferentes padrões alimentares, com aplicações muito diversificadas, dado poderem ser consumidas *in natura*, em sumos, em saladas ou bebidas processadas (Madhuri *et al.*, 2014). De facto, os citrinos são utilizados abundantemente em todos os países, ocupando o primeiro lugar na produção mundial (Abirami e Nirmala, 2013; Rekha e Bhaskar, 2013; Madhuri *et al.*, 2014), com uma produção anual de aproximadamente 80 milhões de toneladas (Gnanasaraswathi *et al.*, 2014). A nível nacional, os citrinos já têm uma relevância significativa, no que se refere à sua produção e, conseqüentemente, ao impacto social e económico do nosso país.

Segundo a edição de 2015 das estatísticas agrícolas do Instituto Nacional de Estatística (INE), referente ao ano agrícola de 2013/2014, globalmente foi caracterizado com um aumento da produção de cereais de inverno, batata, culturas hortícolas e alguns frutos, concretamente, pera, prunóideas (pêssego e ameixa) e citrinos. Esse ano agrícola foi igualmente favorável para as macieiras, com uma produção que ultrapassou 270 mil toneladas. A produção de pera atingiu 210 mil toneladas, o segundo maior registo das últimas três décadas; a produtividade do pêssego (aproximadamente 41 mil toneladas) foi das melhores das últimas décadas, sendo esta substancialmente superior à de 2013 (+79,7%); a produção de amêndoa rondou as 9 mil toneladas, próxima de um ano normal. Relativamente aos citrinos, na produção de laranja globalmente, verificou-se um aumento de 6,2%, face a 2013, atingindo as 252 mil toneladas. A tangerina atingiu

aproximadamente 36 mil toneladas, o limão 15 mil toneladas, a tangerina 1400 toneladas e por fim a toranja 224 toneladas (INE, 2015).

Estas frutas, para além do impacto socioeconómico que representam a nível mundial (Madhuri *et al.*, 2014), têm sido muito valorizadas como parte de uma dieta nutritiva e saborosa (FAO, 1998), considerando-se indispensáveis para a manutenção de uma dieta saudável (Gnanasaraswathi *et al.*, 2014). De facto, os citrinos são reconhecidos como excelentes fontes de vitaminas, minerais e fibras alimentares que são essenciais para o crescimento normal e desenvolvimento e bem-estar nutricional global (FAO, 1998). Os seus óleos essenciais também são reconhecidos pelas suas propriedades medicinais e aromatizantes, facto que potencia a sua produção anual para posteriores utilizações em diferentes indústrias, tais como, alimentar, farmacêutica e dermocosmética. De entre as muitas propriedades fisiológicas, estão descritas atividades antiaterogénica (Tripoli *et al.*, 2007; Ramful *et al.*, 2010), anti-inflamatória (Ramful *et al.*, 2010; Mohammadian *et al.*, 2011; Hegazy e Ibrahim, 2012; Tsujiyama *et al.*, 2013) e antitumoral (Ramful *et al.*, 2010; Mohammadian *et al.*, 2011; Hegazy e Ibrahim, 2012; Rekha e Bhaskar, 2013).

### 2.3.1. Laranja



Figura 2-Laranja

A laranja, *Citrus sinensis*, é uma fruta cítrica (Ortiz, 2002; Al-Juhaimi, 2014), sendo a espécie de citrinos mais cultivada e comercializada no mundo (Chede, 2013). Este fruto é rico em açúcares, ácidos orgânicos, polissacarídeos e diversos fitoquímicos, destacando-se o ácido ascórbico (vitamina C), os tocoferóis (vitamina E), as vitaminas do complexo B, os polifenóis e os carotenoides (Cardeñosa *et al.*, 2015; Singanusong *et al.*, 2015).

### 2.3.2. Limão



**Figura 3-Limão**

O limão, *Citrus limon* também pertence à família Rutaceae (Khan e Riaz, 2015). A produção de limões verifica-se em países e regiões específicas devido ao facto da planta ser muito sensível a baixas temperaturas (Lorente *et al.*, 2014). Rico em fitoquímicos naturais, contem maioritariamente ácido fólico, limonoides, ácidos orgânicos e vitaminas C, A e B, fibra dietética, óleos essenciais e carotenoides (Khan e Riaz, 2015; Molina *et al.*, 2010).

*Citrus limon* apresenta propriedades biológicas benéficas para a saúde de quem o consome (Lorente *et al.*, 2014) devido à presença de compostos fenólicos, maioritariamente flavonoides (Hajimahmoodi *et al.*, 2014). Os seus efeitos benéficos têm sido associados à vitamina C e aos flavonoides, poderosos antioxidantes naturais. Desta forma, sendo o limão rico em flavonoides, este fruto apresenta um papel importante na prevenção de certas doenças, tais como a obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e certos tipos de cancro, além de promover o decréscimo dos níveis séricos de lípidos (Molina *et al.*, 2010). Nos extratos da casca de limão estão também descritas atividades antibacteriana e antifúngica (Mathew *et al.*, 2012).

### 2.3.3. Lima



**Figura 4-Lima**

As limas são cultivadas principalmente em zonas tropicais ou subtropicais (Ortiz, 2002). As limas habitualmente comercializadas são as limas ácidas: *Citrus latifolia*, as de maior dimensão e menos azedas e *Citrus aurantifolia*, também designadas como lima mexicana, de menores dimensões e mais azedas (Nicolosi, 2007).

Atualmente a lima é bastante utilizada na culinária e o seu sumo é aconselhado para o tratamento de hipercloridria, úlceras gástricas, acidez gástrica e infeções renais. Tal com a laranja, a lima é rica em vitaminas do complexo B (B<sub>2</sub> e B<sub>5</sub>) e apresenta níveis elevados de vitamina C. A sua casca é uma fonte rica de fitoquímicos, nomeadamente, flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, limonoides e açúcares redutores. Segundo Singanusong et al. (2015) os compostos fenólicos presentes neste fruto, apresentam atividades antioxidantes, antivíricas, anti-inflamatórias e antineoplásicas.

#### 2.3.4. Toranja



Figura 5-Toranja

A toranja, *Citrus paradisi*, é um citrino híbrido, resultante do cruzamento do pomelo (*Citrus maxima*) ou o seu ancestral com a laranja (*Citrus sinensis*) (Nicolosi, 2007). Este fruto é bastante apreciado devido ao seu sabor adstringente e amargo e ao seu reconhecido valor medicinal. A toranja, tal como todos os outros citrinos apresenta elevado teor de ácido ascórbico, favorável ao sistema imunitário. Apresenta atividade diurética, auxiliando na remoção do excesso de água do organismo, usada no tratamento da celulite. Também é consumida para combater a fadiga muscular e estimular o sistema linfático (Faleye et al., 2012). Outros compostos bioativos presentes na toranja são as flavanonas, nomeadamente, narirutina, naringina, hesperidina, neohesperidina, poncirina, as quais estão associadas a efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antiproliferativos, antineoplásicos, e antimicrobianos (Uckoo et al., 2012).

### 2.3.5. Mandarinas

É um grupo bastante complexo, uma vez que inclui várias espécies, além de um certo número de híbridos que são considerados abaixo:

#### 2.3.5.1. Tangerina



**Figura 6-Tangerina**

A tangerina (*Citrus reticulata*), também conhecida como mandarina é um citrino de cor alaranjada e sabor adocicado. Nativa da China e da Índia é considerada como uma espécie selvagem antiga (Mabberley, 1997).

A tangerina, igualmente pertencente à família Rutaceae tem efeitos benéficos para a saúde. A casca pode ser utilizada no tratamento de doenças degenerativas como a doença de Parkinson; na redução do colesterol; diminuição do risco de doenças cardiovasculares e obesidade; estando descritas propriedades antineoplásicas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antiaterogênicas e antibacterianas. Segundo Jasim (2012), a casca da tangerina é rica em compostos antioxidantes, incluindo os flavonoides, tais como a tangeritina, nobiletina, hesperidina e quercitrina.

#### 2.3.5.2. Clementina



**Figura 7- Clementina**

A clementina (*Citrus clementina*) é um híbrido resultante do cruzamento da laranja (*Citrus sinensis*) e da tangerina (*Citrus reticulata*) (Boudries *et al.*, 2012). Este fruto é valorizado devido ao seu sabor, porém em relação a outros citrinos como o limão e a laranja, existe menos informação relativa às suas propriedades funcionais (Álvarez *et al.*, 2012).

As clementinas são igualmente frutos hesperídeos, de forma oval e de dimensões reduzidas, de casca lisa laranja intensa. Normalmente, este fruto é desprovido de sementes, característica bastante apreciada pelos consumidores em geral (Chao, 2005).

Tal como em todos os outros citrinos anteriormente referidos, os terpenos são predominantes e neste, em concreto, estão descritos o limoneno, o  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, o  $\alpha$ -terpineol, o linalol e o mirceno. Estes compostos orgânicos oleofínicos naturais são importantes para as indústrias alimentar, farmacêutica e dermocosmética conferindo aromas intensos e característicos, para além da sua atividade antioxidante reconhecidas (Buettner *et al.*, 2003).

#### **2.4. Antioxidantes nos frutos**

As frutas cítricas são muito consumidas e apreciadas por todo o mundo, não só devido ao seu paladar agradável como também ao seu reconhecido valor nutricional. São fontes naturais de constituintes bioativos que podem atuar como compostos antioxidantes de defesa ao nosso organismo.

Nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos inúmeros estudos com o objetivo de esclarecer o mecanismo de ação dos radicais livres nos processos fisiológicos, tais como, o envelhecimento precoce, cancro, doenças cardiovasculares, cataratas, diminuição do sistema imune e disfunções cerebrais (Pandey e Rizvi, 2009; Abdullah *et al.*, 2012).

O termo “radicais livres” refere-se a moléculas e/ou a átomos que apresentem um ou mais elétrons desemparelhados nas suas órbitas atômicas ou moleculares. A configuração da camada eletrónica confere a estas espécies uma elevada instabilidade e grau de reatividade, permitindo que aumente a capacidade das mesmas em combinarem-se de forma aleatória e pouco específica com diferentes biomoléculas, nomeadamente, proteínas, lípidos e ácidos nucleicos (Valko *et al.*, 2007; Pala e Gürkan, 2008). Estas

características são fatores que tornam os radicais livres determinantes no desenvolvimento de várias doenças crônicas (Guimarães *et al.*, 2010; Khonkarn *et al.*, 2010; Thorat *et al.*, 2013; Al-Juhaimi, 2014). Embora existam nos sistemas biológicos muitas espécies reativas, as que merecem mais destaque são as espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de azoto (ERN), os radicais derivados de tióis, as espécies reativas de cloro, as espécies reativas de carbono e alguns metais de transição, como por exemplo, o ferro e o cobre (Oliveira *et al.*, 2009).

Os antioxidantes têm a capacidade de proteger as células do organismo de lesões causadas por substâncias instáveis, como é o caso dos radicais livres, promovendo assim a sua destruição, favorecendo o sistema imunológico e evitando o aparecimento e progressão de uma variedade de doenças (Chakraborty *et al.*, 2009). Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações relativamente ao substrato oxidável, são capazes de atrasar ou inibir consideravelmente a oxidação desse substrato (Kumar, 2011; Kunwar e Priyadarsini, 2011; Thorat *et al.*, 2013).

Os antioxidantes produzem efeitos fisiológicos benéficos no organismo e também podem ser utilizados pela indústria alimentar, de forma a conservar o sabor e a cor dos diferentes géneros alimentícios, são também imprescindíveis nos alimentos evitando a destruição das vitaminas presentes nos mesmos e minimizando a deterioração oxidativa de certos alimentos, como óleos e gorduras, que leva à formação de ranço, havendo alteração do sabor e odor, aliado à diminuição da sua qualidade nutricional bem como segurança, uma vez que se verifica a formação de compostos secundários potencialmente tóxicos (Moure *et al.*, 2001; Antolovich *et al.*, 2002; Sarmadi e Ismail, 2010; Santos *et al.*, 2014; Ahmad *et al.*, 2015).

Por esse mesmo motivo, os frutos e os vegetais têm sido alvo de intensos estudos no sentido de provar a importância dos seus consumos, obtendo assim diferentes moléculas químicas cujos mecanismos de ação possam atuar de forma sinérgica e, conseqüentemente reduzirem os danos causado pelos radicais livres. A pesquisa de compostos antioxidantes torna-se cada vez mais importante para a indústria alimentar e para a indústria farmacêutica (Degáspari e Waczczyński, 2004; Montazeri *et al.*, 2011). Vários autores mostraram que frutas e vegetais são especialmente ricos em

antioxidantes naturais e que estes compostos podem diminuir o risco de doenças crônicas, como o cancro, doença de Alzheimer e diabetes (Mohammadian *et al.*, 2011). Por outro lado, alguns estudos demonstraram que o consumo de bebidas e alimentos ricos em polifenóis podem aumentar a capacidade antioxidante do plasma, limitar a incidência de doenças coronárias, apresentarem propriedades antidiabéticas (Degáspari e Waczczynskyj, 2004; Pandey e Rizvi, 2009; Kennedy e Wightman, 2011; Xiao e Högger, 2015).

#### **2.4.1. Antioxidantes maioritários nos citrinos**

Relativamente às frutas cítricas, estas são conhecidas como fontes de constituintes antioxidantes, que apresentam várias ações benéficas ao ser humano. De entre esses compostos bioativos, destacam-se o ácido ascórbico, os compostos fenólicos e os carotenoides (Wang *et al.*, 2008; Ghasemi *et al.*, 2009; Goulas e Manganaris, 2012).

##### **2.4.1.1. Vitamina C**

A vitamina C (ácido ascórbico) é um micronutriente essencial, necessário para a função metabólica normal do corpo (Rahman *et al.*, 2007; Mohammed *et al.*, 2009; Mussa e Sharaa, 2014) comumente encontrada nos citrinos (Rahman *et al.*, 2007; Mohammed *et al.*, 2009; Rekha *et al.*, 2012; Mussa e Sharaa, 2014). Embora o teor de ácido ascórbico varie consideravelmente mediante a espécie, maturação, condições edafoclimáticas, métodos de preparação e consumo (Mohammed *et al.*, 2009; Mussa e Sharaa, 2014), a sua ingestão através da dieta é fundamental, uma vez que o metabolismo humano não tem a capacidade de sintetizar (Rahman *et al.*, 2007; Mohammed *et al.*, 2009; Rekha *et al.*, 2012; Mussa e Sharaa, 2014; Shishehbore e Aghamiri, 2014). Por outro lado, o ácido ascórbico, para além de ser um reconhecido antioxidante natural, tem um papel importante na regeneração de outros antioxidantes, como por exemplo, a vitamina E (Shishehbore e Aghamiri, 2014); redução dos níveis plasmáticos de colesterol e regulação da pressão arterial (Rahman *et al.*, 2007; Mohammed *et al.*, 2009; Rekha *et al.*, 2012; Mussa e Sharaa, 2014); prevenção do escorbuto; manutenção da pele, gengivas e vasos sanguíneos saudáveis (Rekha *et al.*, 2012); inibição da cascata inflamatória (Hazewindus *et al.*, 2012). Esta vitamina é essencial para a síntese de

colagénio, carnitina e norepinefrina (neurotransmissor) (Shishehbore e Aghamiri, 2014). São-lhe reconhecidas algumas funções biológicas, nomeadamente na diminuição do risco de arteriosclerose, doenças cardiovasculares e algumas formas de cancro (Rekha *et al.*, 2012), incluindo o cancro da mama, colo do útero, cólon, reto, pulmão, boca, próstata e estômago (Rahman *et al.*, 2007; Mohammed *et al.*, 2009; Mussa e Sharaa, 2014).

#### **2.4.1.2. Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são uma das maiores classes de metabolitos secundários das plantas (Degáspari e Waczczyński, 2004), quimicamente definidos como substâncias que possuem um ou mais anéis aromáticos contendo pelo menos um grupo hidroxilo (Soares *et al.*, 2008). Os compostos fenólicos ou polifenóis exercem funções de defesa contra a radiação ultravioleta, microorganismos e insetos, sendo também responsáveis pela pigmentação e algumas características organolépticas dos alimentos (Nakajima *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos existentes nos citrinos abrangem maioritariamente os ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides e taninos (Dubick e Omaye, 2001).

De entre os compostos fenólicos existentes nestes frutos, os flavonoides constituem o grupo mais representativo, podendo ainda dividir-se em pequenos subgrupos tais como, antocianinas (cianidina, delphinidina), flavanas (catequina, epicatequina, luteoforol, procianidina, theaflavina), flavanonas (hesperidina, naringenina), flavonas (apigenina, luteolina, diomestina, tangeritina, nobiletina, tricetina), flavonóis (quercetina, rutina, miricetina) e isoflavonoides (daidzeína, genisteína) (Gattuso *et al.*, 2007).

As flavanonas, as flavonas e os flavonóis são os subgrupos com maior representatividade nos citrinos. As flavanonas que existem como mono ou diglicosídicas contribuem para o sabor dos frutos cítricos, nomeadamente a hesperidina, a narirutina, a naringina, e a neohesperidina (Sivam, 2002). As laranjas contêm hesperitina e naringenina que raramente ocorrem como agliconas livres. De facto, as flavanonas glicosídicas dominantes nas laranjas doces (*C. sinensis*) são a hesperidina e a narirutina, enquanto nas laranjas azedas (*C. aurantium*) predominam as neohesperidina e naringina. A principal diferença entre as flavanonas glicosídicas de laranjas doces e de laranjas azedas está nas moléculas de açúcar, que influenciam o gosto. O açúcar

rutinose (6-O- $\alpha$ -A-rhamnosyl- $\beta$ -D-glucose) causa nas flavanonas hesperidina e narirutina um sabor neutro e é relativamente elevado em laranjas doces e tangerinas, enquanto o açúcar neohesperidose (2-O- $\alpha$ -L-rhamnosyl- $\beta$ -D-glicose) apresenta concentrações superiores nas laranjas azedas e na toranja, conferindo um sabor amargo ou picante às flavanonas glicosídicas neohesperidina e naringina (Peterson *et al.*, 2006).

#### **2.4.1.3. Carotenoides**

Os carotenoides pertencem a uma família de pigmentos naturais, dos quais mais de 600 variantes estruturais estão atualmente reconhecidas e quimicamente caracterizadas (Stahl e Sies, 2003; Rao e Rao, 2007). Estes compostos são moléculas isoprenoides lipossolúveis que são comuns na natureza (Mortensen, 2006; Burgos *et al.*, 2012; Malik *et al.*, 2012) e desempenham um papel importante na proteção das plantas contra processos de fotooxidação (Stahl e Sies, 2003). São responsáveis por muitas das cores das plantas, frutas e flores que incluem os tons vermelho, laranja, bem como pelas cores de alguns pássaros, insetos, peixes e crustáceos (Stahl e Sies, 2003; Santhos *et al.*, 2011). Apenas as plantas, bactérias, fungos e algas podem sintetizar carotenoides, mas muitos animais possuem a capacidade de os incorporar através da dieta (e.g., conversão de  $\beta$ -caroteno em vitamina A) (Stahl e Sies, 2003; Mortensen, 2006).

No plasma humano predominam o  $\beta$ -caroteno e o licopeno, os quais estão descritos como compostos antioxidantes, promotores de elevados benefícios para a saúde, nomeadamente na prevenção de cancro, doenças cardiovasculares e oftalmológicas (Stahl e Sies, 2003; Barba *et al.*, 2006; Fiedor e Burda, 2014). De facto, atualmente, o grande interesse pelos carotenoides deve-se à sua atividade de pró-vitamina A, sendo esta vitamina interveniente na síntese de hormonas, na resposta imune e na regulação do crescimento e diferenciação celular, bem como à sua ação antioxidante sobre os radicais de oxigénio e à diminuição do stresse oxidativo no organismo (Stahl e Sies, 2003; Barba *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2007; Burgos *et al.*, 2012; Poiroux-Gonord *et al.*, 2012). Estes compostos são também amplamente utilizados como corantes alimentares (Malik *et al.*, 2012).

A cor dos citrinos deve-se, principalmente, à presença dos carotenoides (Kato *et al.*, 2004; Rodrigo *et al.*, 2004), os quais conferem diferentes tonalidades que variam entre o amarelo, laranja e vermelho (Kato *et al.*, 2004).

## **2.5. Aplicação dos subprodutos dos citrinos**

Os subprodutos provenientes dos citrinos consideram-se relevantes pois são ricos em ingredientes funcionais, entre os quais se destacam os flavonoides, fibras alimentares e óleos essenciais (Vasudeva e Sharma, 2012). Deste modo, estes subprodutos podem utilizar-se em diversas formulações alimentares ou no fabrico de alimentos funcionais (Al-Juhaimi, 2014).

São relatadas atividades biológicas na casca dos citrinos, nomeadamente atividades antimicrobiana e antioxidante (Madhuri *et al.*, 2014) que lhes permitem ser incorporados tanto em fármacos como em suplementos alimentares. Pode ainda ser avaliada a alternativa do uso dos compostos bioativos presentes nos subprodutos como a casca e polpa ou outros resíduos do fruto, como antioxidantes ao invés dos aditivos alimentares sintéticos que apresentam potenciais riscos para a saúde. (Al-Juhaimi, 2014; Gnanasaraswathi *et al.*, 2014).

De acordo com a FAO, em 2014, a produção mundial de laranja atingiu 68 milhões de toneladas, representando 8,5% da produção total de frutas. Aproximadamente 40-60% das laranjas são processadas para a produção de sumo, sendo que 50-60% do peso total da fruta fresca são resíduos, incluindo sementes e cascas. Perante um valor tão elevado de subprodutos formados e tendo em conta que a riqueza em compostos bioativos está mais concentrada na casca dos frutos, muitos estudos têm sido efetuados com um objetivo comum: o reaproveitamento dos mesmos. Esta ideia, abrange o conceito de sustentabilidade, dado integrar o sector social, económico e ambiental, acrescentando a possibilidade de promoção da saúde (FAO, 2014).

## **CAPÍTULO III. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo geral**

Tendo em consideração que o reaproveitamento dos recursos naturais é uma aposta do futuro no sentido de aproveitar e valorizar os produtos e resíduos nacionais, baseados no conceito de sustentabilidade, de forma a promover o desenvolvimento económico e social e com o conseqüente melhoramento do meio ambiente e dos recursos naturais, o objetivo geral deste trabalho visou realizar um estudo comparativo de subprodutos alimentares provenientes de seis espécies de citrinos de origem portuguesa: laranja, limão, lima, toranja, tangerina e clementina, tendo em consideração a parte edível (polpa) e não edível (casca), através da avaliação de fitoquímicos e atividade antioxidante.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Determinar o teor de compostos bioativos (teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e carotenoides (licopeno e  $\beta$ -caroteno) de cada citrino (polpa e casca).
- Determinar a atividade antioxidante da polpa e da casca de cada fruto estudado (método DPPH\*).
- Efetuar uma análise sensorial, através do estudo sobre o grau de aceitação por parte do consumidor, recorrendo à elaboração de biscoitos de manteiga enriquecidos com os subprodutos dos frutos cítricos estudados.

## **CAPÍTULO IV. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Amostras**

As amostras estudadas foram cascas e polpas de frutos cítricos habitualmente consumidos pela população portuguesa: laranja (*Citrus sinensis*), limão (*Citrus limon*), lima (*Citrus aurantifolia*), tangerina (*Citrus reticulata*), clementina (*Citrus clementina*) e toranja (*Citrus paradisi*). Todas as espécies, de produção nacional, foram adquiridas em 2014. As cascas e as respetivas polpas foram submetidas a um processo de trituração num moinho (Moulinex), para obter uma melhor homogeneização do lote em estudo. Posteriormente, todas as amostras foram congeladas a -20°C até ao momento da análise.

### **4.2. Compostos bioativos e atividade antioxidante**

O teor de compostos bioativos e atividade antioxidante foi determinado através de extratos aquosos obtidos por um processo de partição do soluto sólido-líquido.

#### **4.2.1. Preparação dos extratos**

Por conhecimento prévio do comportamento de outros subprodutos estudados por diversos autores, e visando condição sustentável de obtenção dos extratos recorreu-se à água destilada como solvente. Prepararam-se extratos (1 g/ 50 mL) em triplicado a partir de cada amostra estudada. A extração foi efetuada em centrífuga Labofrege 200 (Heraeus Sepatech), a 5000 rpm, durante 30 minutos e os extratos obtidos foram filtrados e congelados a - 20 °C para posterior análise. Para a quantificação dos carotenoides procedeu-se à extração com uma mistura de acetona-hexano (4:6), devido ao facto de estes compostos serem de natureza apolar. Os extratos aquosos obtidos foram utilizados nas quantificações dos fenólicos e flavonoides totais e respetiva atividade antioxidante.

#### **4.2.2. Determinação de compostos fenólicos totais**

O teor de fenólicos totais foi determinado por um método espectrofotométrico, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, segundo metodologia recentemente proposta por Vinha *et al.* (2015). Este ensaio baseia-se na oxidação dos grupos hidroxilo dos fenóis, em

meio básico, pelo reagente de Folin-Ciocalteu (que consiste na mistura do ácido fosfomolibídico e do ácido fosfotungústico). A redução deste reagente pelos compostos fenólicos produz uma mistura de óxidos de tungstênio e molibdênio de coloração azul característica, monitorizados espectrofotometricamente a 765 nm. Para elaborar a reta de calibração utilizou-se um padrão de ácido gálico.

Resumidamente colocaram-se num tubo de ensaio 500 µL de extrato (sobrenadante), aos quais se adicionaram 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (RFC) diluído em água destilada (1:10) e 2,0 mL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 7,5 %). Os extratos foram colocados em repouso à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos. Foram efetuadas leituras de absorvências a 765 nm em espectrofotómetro UV/Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis). Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) em mg por g de amostra a partir da equação da reta ( $Y = 0,0018X + 0,0159$ ;  $r = 0,9999$ ).

#### **4.2.3. Determinação dos flavonoides totais**

Os flavonoides totais foram quantificados segundo metodologia descrita por Costa *et al.* (2014), com ligeiras modificações. A técnica envolveu a medida da absorvência, a 510 nm, do complexo AlCl<sub>3</sub>-flavonoide, utilizando a reta de calibração de epicatequina ( $Y = 0,0003X + 0,0055$ ;  $r = 0,9985$ ) efetuada aquando das determinações.

Num tubo de ensaio misturaram-se 1 mL de extrato, 4 mL de água destilada e 300 µL de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) (10 %). Após um minuto foram adicionados 2 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) (1 mol/ L) e 2,4 mL de água destilada. Após agitação em vortex efetuaram-se as leituras. Todos os ensaios foram feitos em triplicado e os resultados expressos em mg equivalentes de epicatequina (EEC)/ g de amostra.

#### **4.2.4. Determinação dos carotenoides**

Os carotenoides foram quantificados por espectrofotometria seguindo a metodologia descrita por Vinha *et al.* (2014). Na determinação dos carotenoides totais foram lidas as absorvências de cada extrato (sobrenadante), utilizando-se um espectrofotómetro UV/Vis (Thermo, Genesys 10S UV-Vis), a diferentes comprimentos de onda: 663, 645, 505 e 453 nm, sendo possível, desta forma, quantificar os teores de licopeno e β-caroteno de

cada extrato. Os extratos (1g/ 10 mL) foram obtidos a partir de uma centrifugação a 5000 rpm durante 30 minutos, utilizando uma mistura de solventes apolares (acetona/ n-hexano, 4:6, v/v). Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos em mg por g de amostra e os teores de cada pigmento foram obtidos de acordo com as seguintes equações:

- Licopeno (mg/ g) =  $-0,0458A_{663} + 0,204A_{645} + 0,372A_{505} - 0,0806A_{453}$
- $\beta$ -Caroteno (mg/ g) =  $0,216A_{663} - 1,22A_{645} - 0,304A_{505} + 0,0452A_{453}$

### 4.3. Atividade antioxidante

Diversas técnicas analíticas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas de compostos bioativos que, isoladamente ou sinergicamente, se tornam importantes na promoção da saúde. De entre muitos métodos utilizados destaca-se o método de redução do radical livre DPPH<sup>•</sup> (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo).

#### 4.3.1. Inibição do radical livre DPPH<sup>•</sup>

A determinação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de redução do radical livre DPPH<sup>•</sup>. Este constitui um método colorimétrico no qual o DPPH<sup>•</sup> é estabilizado por substâncias com propriedades antioxidantes, sendo um método vulgarmente usado para a avaliação da capacidade redutora dos radicais livres pela ação dos compostos bioativos com propriedades antioxidantes. O radical livre DPPH<sup>•</sup> (coloração violeta) apresenta um máximo de absorvência a 515 nm. O ensaio consistiu essencialmente numa reação de oxidação-redução, após a adição do antioxidante verificou-se uma diminuição da absorvência, proporcional à concentração e à atividade antioxidante da amostra (Brand-Williams *et al.*, 1995; Arnao, 2000). Este método apresenta diversas vantagens entre as quais o facto do radical livre DPPH<sup>•</sup> ser muito estável e poder ser adquirido diretamente, estando comercialmente disponível (Arnao, 2000; Pyrzyńska e Pekal, 2013).

O procedimento experimental consistiu em pipetar 20  $\mu$ L de amostra (extrato de cada casca e polpa) e 180  $\mu$ L de solução de DPPH<sup>•</sup> (0,06 mM) e posterior homogeneização. As leituras foram efetuadas em intervalos de 2 em 2 minutos durante 40 minutos, num

leitor de microplacas de 96 poços. A atividade antioxidante foi expressa em percentagem de inibição (%) segundo a seguinte equação:

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{\text{Abs branco} - \text{Abs final}}{\text{Abs branco}} \times 100$$

Em que a Abs branco corresponde à absorvência da solução de DPPH<sup>\*</sup> no primeiro tempo de leitura e a Abs final corresponde à absorvência do extrato após obtenção de absorvências constantes.

#### **4.4. Análise sensorial**

Segundo o IFT (Institute of Food Science and Technology) a análise sensorial é uma disciplina usada para provocar, medir, analisar e interpretar as reações produzidas pelas características dos alimentos e materiais, como elas são percebidas pelos órgãos da visão, olfato, gosto, tato e audição. Como tal, para avaliar o grau de aceitação do novo género alimentar desenvolvido (biscoitos que incorporam cascas de citrinos), foi igualmente realizada uma análise sensorial recorrendo a um painel de provadores não treinados.

Através desta análise pretendeu-se verificar de que forma a aparência, o sabor e o aroma dos biscoitos com cascas de citrinos influenciavam a opção de compra por parte dos consumidores. Os 6 biscoitos foram servidos em diferentes pratos descartáveis e acompanhados com um copo de água.

Os consumidores foram divididos em três grupos etários diferentes, no primeiro incluíram-se os que tinham idades compreendidas entre 18 e 29, no segundo compreendidas entre 30 e 49 e no terceiro entre 50 e 70 anos, cada grupo constituído por 50 pessoas, participando um total de 150 indivíduos.

Os provadores avaliaram as amostras de forma monádica sequencial, usando escala de pontuação de Likert com 9 categorias, de extremamente agradável a extremamente desagradável. As amostras foram também avaliadas em relação intenção de compra (“compraria este produto?”).

A escala hedônica híbrida de 9 pontos ou escala de Likert (0=Extremamente desagradável; 5=nem agradável nem desagradável; 9=Extremamente agradável), proposta por Vilanueva (2003) foi utilizada como instrumento de trabalho de medição da preferência.

#### **4.5. Análise estatística**

A análise de dados foi realizada usando o programa IBM SPSS STATISTICS, 22.0 (IBM Corporation, New York, USA (2015)). Os resultados foram descritos através de contagens e respectivas percentagens para variáveis qualitativas nominais e ordinais, e ainda pelo cálculo da média e desvio padrão para os resultados da apreciação da aparência, aroma e sabor (escala de Likert) para comparação com resultados de outros trabalhos.

## **CAPITULO V. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os teores de compostos bioativos, a avaliação da atividade antioxidante das cascas e polpas dos diferentes citrinos, bem como os resultados da análise sensorial realizada, após elaboração de biscoitos enriquecidos com as cascas dos diferentes frutos estudados.

### **5.1. Solvente Extrator**

Os compostos fenólicos são na sua maioria polares, desta forma aumentando a polaridade do solvente, obtém-se um maior rendimento de extração destes compostos (Abdullah *et al.*, 2012). Durante a realização da pesquisa bibliográfica verificou-se que existem muitos estudos associados às condições de extração dos compostos bioativos. No entanto, também se verificou que a maioria desses estudos apenas valorizou a quantidade de compostos extraídos, independentemente dos efeitos nocivos que esses solventes possam apresentar. Neste trabalho optou-se pela utilização da água como solvente extrator, dado a sua inocuidade, custos e capacidade extrativa. Atualmente os estudos desenvolvidos em matrizes alimentares recorrem ao uso de solventes não tóxicos. Sousa *et al.* (2011) determinaram os teores de fenólicos totais dos resíduos das polpas das frutas tropicais acerola (*Malpighia glabra* L.), goiaba (*Psidium guayaba* L.), abacaxi (*Ananas comosus* L.), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), bacuri (*Platonia insignis*) e graviola (*Annona muricata* L.), recorrendo a extratos aquosos e hidroalcoólicos. Gengaihi *et al.* (2014) também avaliaram o teor de compostos bioativos em extratos aquosos e etanólicos de mostos. Outros autores também descreveram outros solventes para a extração de fenólicos, tais como éter etílico (Goulas e Manganaris, 2012) ou metanol (Abeyasinghe *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2012; Xi *et al.*, 2014).

## 5.2. Análise dos compostos bioativos

As propriedades antioxidantes consistem em retardar a oxidação de vários compostos "importantes para a vida", inibindo a iniciação ou a propagação de reações em cadeia (Ramful *et al.*, 2010). Desde a prevenção de reações de oxidação em alimentos, medicamentos e cosméticos até ao papel das espécies reativas de oxigénio (ERO) em doenças como o cancro, doenças cardiovasculares, inflamatórias, neurodegenerativas e autoimunes, a atividade antioxidante é fundamental para retardar qualquer um dos casos (Ghafar *et al.*, 2010; Boudries *et al.*, 2012; Vilaplana *et al.*, 2014). Estudos epidemiológicos demonstraram uma relação direta entre o consumo de produtos ricos em antioxidantes e a diminuição da morbidade e mortalidade (Huang *et al.*, 2005). Os compostos fenólicos são considerados um dos grupos mais importantes a contribuir para a atividade antioxidante. O consumo de alimentos ricos neste tipo de compostos contribui para a prevenção de doenças (Cartea *et al.*, 2011).

O conteúdo de fenólicos totais dos extratos aquosos foi determinado através de um método colorimétrico, usando o reagente de Folin-Ciocalteu. Este método permite a avaliação de todos os flavonoides, antocianinas e outros compostos fenólicos (não-flavonoides) presentes nas amostras (Abdullah *et al.*, 2012). No entanto, os valores de compostos fenólicos totais devem ser interpretados com prudência pois relatos da literatura têm argumentado que existe a possibilidade de interferência de outros agentes presentes nos alimentos, como os carotenoides, aminoácidos, açúcares e vitamina C, que podem reagir com o reagente Folin-Ciocalteu. (Ramful *et al.*, 2010; Ghafar *et al.*, 2010; Vilaplana *et al.*, 2014).

Os resultados da análise aos compostos fenólicos apresentados nas Figuras 8 e 9 estão expressos em equivalentes de ácido gálico (mg EAG)/ g de amostra. Numa primeira análise observam-se diferenças entre todas as cascas dos citrinos estudados, apresentando variações entre 219,5 e 457,1 mg EAG/ g, correspondendo à lima e à clementina, respetivamente. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os teores de fenólicos totais da toranja e da tangerina. Os resultados obtidos demonstram que a concentração total de polifenóis nas cascas varia bastante de acordo

com a espécie. Depende ainda de variáveis como as condições ambientais do local de origem e da época de colheita (Quirós *et al.*, 2010).

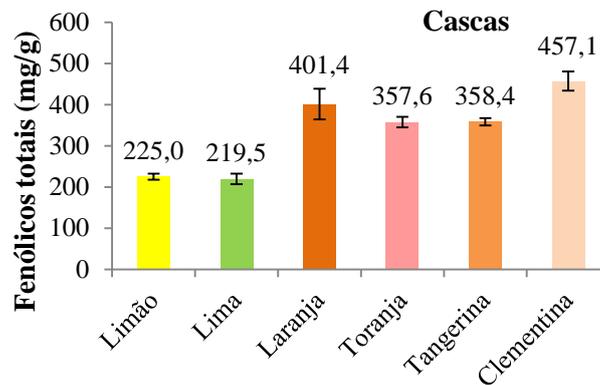


Figura 8-Fenólicos totais (mg EAG/ g) das cascas dos citrinos

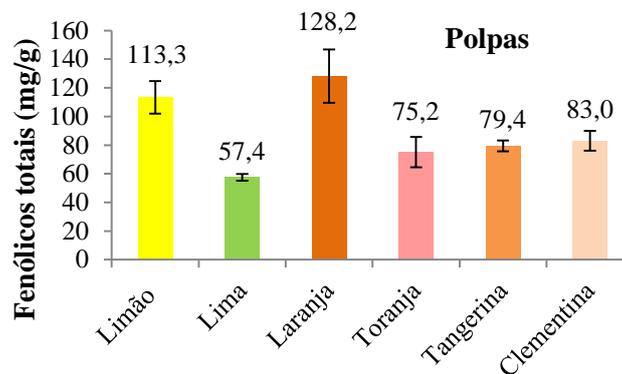
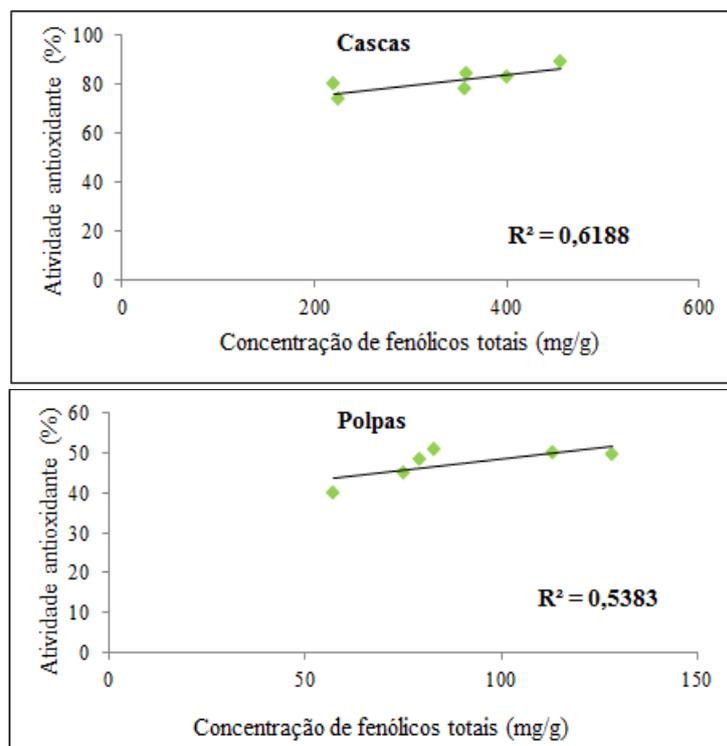


Figura 9-Fenólicos totais (mg EAG/ g) das polpas dos citrinos

Segundo Trucom (2009), as cascas de limão contêm maiores teores de vitamina C na casca (~150 mg/ 100g) do que a polpa (40 mg/ 100g). Também é na casca deste fruto que se concentra a citrina (vitamina P). Este fundamento supracitado potencia ainda mais as cascas dos outros citrinos, toranja, tangerina e clementina, que são os menos utilizados e cujos teores de fenólicos mostram-se bastante superiores aos encontrados no limão. Por outro lado, os resultados apontam para uma maior valorização dos resíduos nacionais face a outros semelhantes mas provenientes de outros países. Por exemplo, Abdullah *et al.* (2012) descreveram um teor de fenólicos totais em extratos aquosos de

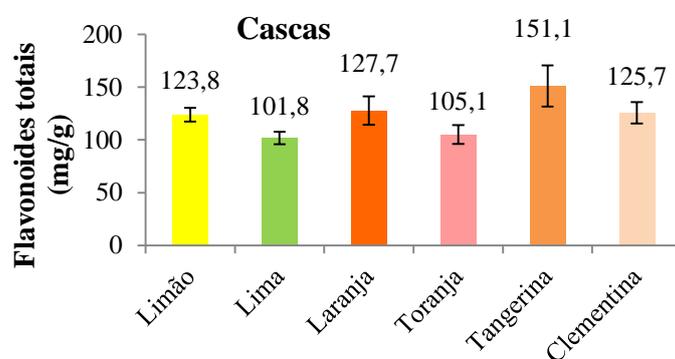
cascas de laranja inferiores aos descritos neste trabalho (357,23 mg EAG/ g e 401,4 mg EAG/ g, respetivamente).

Relativamente às diferenças encontradas destes compostos nas polpas e respetivas cascas, as Figuras 8 e 9 mostram valores discrepantes. O teor de fenólicos totais descritos nas polpas dos citrinos, mostram uma tendência idêntica aos valores observados nas cascas. As polpas de laranja e de limão mostram superioridade, sendo que a toranja e a tangerina não apresentam diferenças significativas. Curiosamente, a lima mostrou ser o fruto cítrico com menores teores de fenólicos totais, tanto na casca como na polpa. De uma maneira geral conclui-se que o conteúdo de fenólicos totais é menor nas polpas do que nas cascas, mostrando concordância com outros estudos semelhantes (Abdullah *et al.*, 2012; Guimarães *et al.*, 2010). Os elevados valores obtidos nos compostos fenólicos nas cascas das espécies estudadas permitem antever o resultado da atividade antioxidante, que se espera que também seja mais elevado nas cascas do que nas polpas. De facto, a correlação obtida dos compostos fenólicos com a atividade antioxidante (DPPH•) é superior nas cascas, como é possível verificar pela Figura 10.

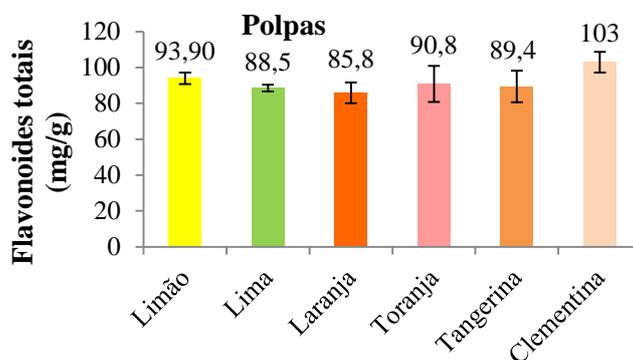


**Figura 10-**Correlação de Pearson obtida entre a atividade antioxidante e o teor de fenólicos totais

Os flavonoides constituem um dos grupos de compostos naturais mais diversificado e vasto e são provavelmente os compostos fenólicos mais importantes (Ghafar *et al.*, 2010). O conteúdo total em flavonoides das cascas e polpas dos diferentes citrinos foi realizado através da complexação do extrato com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ). O íon  $\text{Al}^{3+}$  liga-se ao grupo cetona ou hidroxilo dos flavonoides através de uma reação com transferência de elétrons, o que leva à produção de uma coloração amarela intensa quando observada em espectrofotômetro UV-Vis a uma absorvência máxima de 510 nm (Abdullah *et al.*, 2012). Os resultados obtidos encontram-se representados nas Figuras 11 e 12, correspondendo às cascas e polpas, respectivamente.



**Figura 11-**Flavonoides totais (mg EEC/ g) das cascas dos citrinos

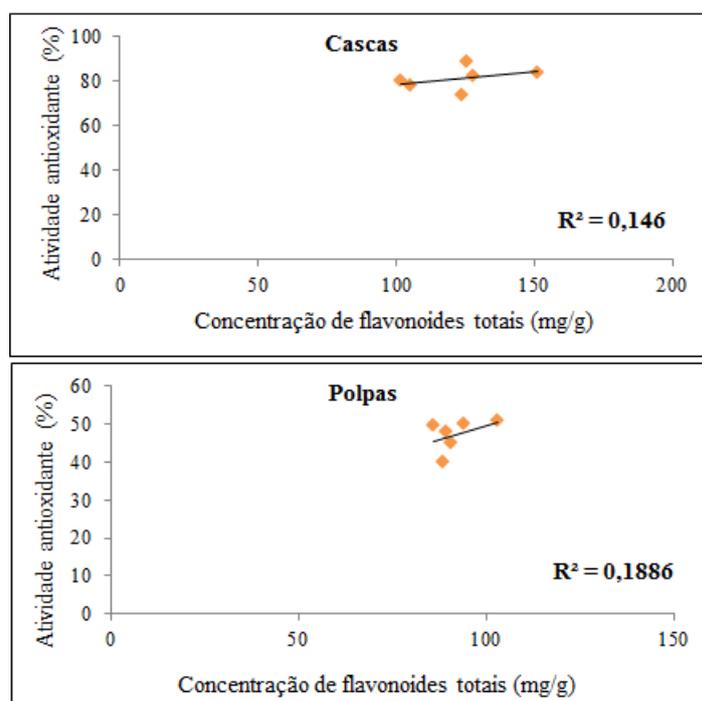


**Figura 12-**Flavonoides totais (mg EEC/ g) das polpas dos citrinos

Analisando a Figura 11, pode-se observar que a casca da tangerina lidera os níveis de flavonoides (151,1 mg/ g), seguindo-se as cascas de laranja (127,7 mg/ g), da clementina (125,7 mg/g) e do limão (123,8 mg/ g), com diferenças pouco significativas. Uma vez mais, as cascas dos citrinos nacionais mostraram teores de bioativos superiores

aos descritos por Abdullah *et al.* (2012), os quais apresentaram teores de flavonoides nas cascas de laranja na ordem dos 22,79 mg /g. Tal como aconteceu com os fenólicos totais, a lima mostrou teores inferiores de flavonoides (101,8 mg/ g). Num contexto geral, o teor de flavonoides presente nas cascas é em média 25% superior aos teores encontrados nas polpas dos 6 citrinos. Uma vez mais, este estudo evidenciou que as cascas dos frutos são mais ricas em compostos bioativos que as polpas, mostrando-se concordantes com outros estudos anteriores (Guimarães *et al.*, 2010; Goulas e Manganaris, 2012).

Estes resultados sugerem que a variação no teor dos compostos fenólicos supracitados pode resultar em diferentes respostas biológicas, e apesar dos fenólicos totais e dos flavonoides representarem os constituintes maioritários, outros compostos podem interferir de forma positiva, contribuindo para o aumento das propriedades biológicas associadas à ingestão dos frutos cítricos. Muitos estudos atribuem propriedades antioxidantes aos flavonoides (Ghafar *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2011; Gengaihi *et al.*, 2014), no entanto, neste estudo, ficou evidente que a correlação entre a atividade antioxidante e estes compostos é muito baixa (Figura 13).



**Figura 13-**Correlação de Pearson obtida entre a atividade antioxidante e o teor de flavonoides totais

De facto, as frutas contêm muitos compostos com elevada atividade antioxidante, como as vitaminas C e E, os carotenoides, as clorofilas e uma variedade de fitoquímicos, incluindo os compostos fenólicos simples, glicosídeos e flavonoides. Propõe-se que sejam realizados mais estudos, nomeadamente, na quantificação de outros compostos fenólicos, igualmente com propriedades biológicas reconhecidas e que possam potenciar a atividade antioxidante.

Os carotenoides presentes nos frutos desempenham um papel importante na saúde humana, como agentes de prevenção contra o desenvolvimento de doenças crónicas. Os carotenoides são pigmentos responsáveis pela cor externa e interna das frutas cítricas. Os citrinos são fontes complexas de carotenoides, contendo o maior número destes compostos relativamente aos outros frutos (Alquezar *et al.*, 2008; Goulas e Manganaris, 2012). No entanto, a concentração de carotenoides é fortemente dependente das variedades *Citrus* e das condições edafoclimáticas (Molina *et al.*, 2010).

De acordo com os resultados presentes na Tabela 1 observaram-se diferenças significativas de resultados entre as espécies de frutas e entre as polpas e cascas de cada espécie.

**Tabela 1**-Teor de carotenoides ( $\mu\text{g/g}$ ) obtidos nas cascas e polpas dos citrinos estudados

\*(--): Valores não detetados.

Cascas	Licopeno	$\beta$ -Caroteno	Polpas	Licopeno	$\beta$ -Caroteno
<b>Limão</b>	0,385 $\pm$ 0,08	0,255 $\pm$ 0,22	<b>Limão</b>	0,2416 $\pm$ 0,10	0,130 $\pm$ 0,23
<b>Lima</b>	----	7,32 $\pm$ 0,26	<b>Lima</b>	0,0584 $\pm$ 0,02	0,0723 $\pm$ 0,13
<b>Laranja</b>	----	8,82 $\pm$ 1,20	<b>Laranja</b>	----	1,84 $\pm$ 0,49
<b>Toranja</b>	11,94 $\pm$ 1,95	7,99 $\pm$ 0,59	<b>Toranja</b>	3,18 $\pm$ 1,32	1,50 $\pm$ 0,41
<b>Tangerina</b>	0,0674 $\pm$ 0,08	5,19 $\pm$ 0,32	<b>Tangerina</b>	0,471 $\pm$ 0,05	0,916 $\pm$ 0,39
<b>Clementina</b>	----	14,80 $\pm$ 0,89	<b>Clementina</b>	----	1,60 $\pm$ 0,73

Relativamente ao  $\beta$ -caroteno, as concentrações deste composto foram manifestamente superiores nas cascas do que nas polpas de todos os frutos, sendo que a casca da clementina apresentou o maior valor (14,80  $\mu\text{g/g}$ ). As polpas da laranja e da toranja apresentaram valores idênticos mas significativamente superiores aos encontrados nas

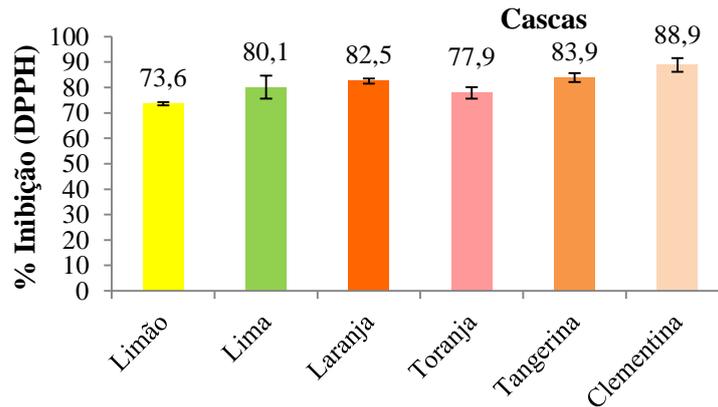
outras polpas. Embora com diferenças muito significativas entre eles, a ordem decrescente de  $\beta$ -caroteno existente nas cascas e nas polpas dos citrinos mostrou-se concordante, observando-se um decréscimo sequencial entre clementina > laranja > toranja > tangerina > lima > limão. Estes dados mostram-se concordantes com os dados publicados na bibliografia. Silva *et al.* (2010) descreveram diversas fontes vegetais ricas em carotenoides, entre as quais a laranja e a tangerina. Também Chedea *et al.* (2010) descreveram elevados teores de apocarotenoides e  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno nas cascas de duas variedades de laranja (Valencia e Navel). O licopeno, responsável pelas tonalidades “vermelhas” do reino vegetal também foi encontrado no limão, na toranja e na tangerina. Estes valores foram pouco claros, no entanto, face à escassez de bibliografia, não podem ser comparados com outros estudos idênticos. Empiricamente poder-se-á afirmar que os teores de licopeno foram superiores na toranja, uma vez que este fruto apresenta uma tonalidade mais “avermelhada” que todos os outros citrinos.

### **5.3. Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante de uma e qualquer matriz vegetal poderá sugerir a contribuição relativa da soma dos seus constituintes com ação antioxidante. De acordo com os dados publicados até à data, os compostos fenólicos, os carotenoides e a vitamina C são os principais antioxidantes encontrados nos frutos (Egea *et al.*, 2010).

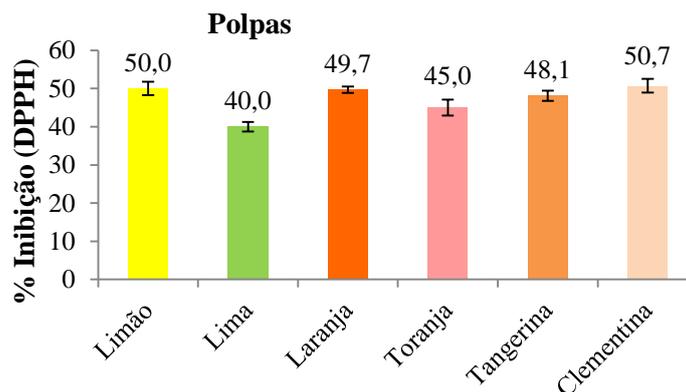
Para a determinação da atividade antioxidante, recorreu-se ao método do DPPH<sup>•</sup>, uma vez que se trata de um método rápido, sensível e reprodutível, exigindo um equipamento de laboratório simples e convencional para a determinação da atividade antioxidante de extratos de frutas e de legumes (Boudries *et al.*, 2012).

Os resultados da análise da atividade antioxidante estão apresentados nas Figuras 14 e 15 e expressos em % de inibição do radical DPPH<sup>•</sup>.



**Figura 14-**Atividade antioxidante das cascas dos citrinos

Todas as cascas dos citrinos revelam uma elevada atividade antioxidante (Figura 14), sendo os seus valores próximos entre si. A casca da clementina foi a que apresentou a maior atividade antioxidante (88,9%), seguida da tangerina (83,9%), da laranja (82,5%), da lima (80,1%), da toranja (77,9%) e do limão (73,6%). Al-Juhaimi (2014) avaliou a atividade antioxidante das cascas e polpas da laranja, tangerina e limão, tendo obtido valores significativamente inferiores: 67,58%; 68,57% e 46,98%, respetivamente. Esta diferença pode ser justificada pelas interferências associadas aos fatores intrínsecos (maturação, genética e variedades) como aos fatores extrínsecos (clima, solo, radiação solar). De facto, é do conhecimento geral que a síntese de metabolitos secundários pelas plantas depende fortemente destes fatores.



**Figura 15-**Atividade antioxidante das polpas dos citrinos

As polpas, tal como aconteceu com os compostos bioativos, apresentaram menores valores de atividade antioxidante. Tendo em conta que estes compostos contribuem para a atividade antioxidante, apesar de outros compostos hidrofílicos tais

como péptidos, vitaminas poderem também influenciar o poder antioxidante (Abdullah *et al.*, 2012), é normal que as polpas apresentem menor percentagem de inibição do radical livre DPPH<sup>•</sup> que as cascas.

Através da observação da Figura 15 pode-se constatar que a atividade antioxidante obtida em todas as polpas foi semelhante, variando entre 50,7% (clementina) e 40,0% (lima). Assim, a polpa com maior potencial antioxidante é a clementina (50,7%), de seguida encontram-se as polpas do limão (50,0%), da laranja (49,7%), da tangerina (48,1%) e da lima (40,0%). Relativamente ao estudo de Al-Juhaimi (2014) verificou-se que a atividade antioxidante das polpas da laranja (69,31%), tangerina (62,82%) e limão (59,60%) foi superior às obtidas neste estudo. Um dos fatores que possa fundamentar esta diferença é o recurso ao metanol como solvente.

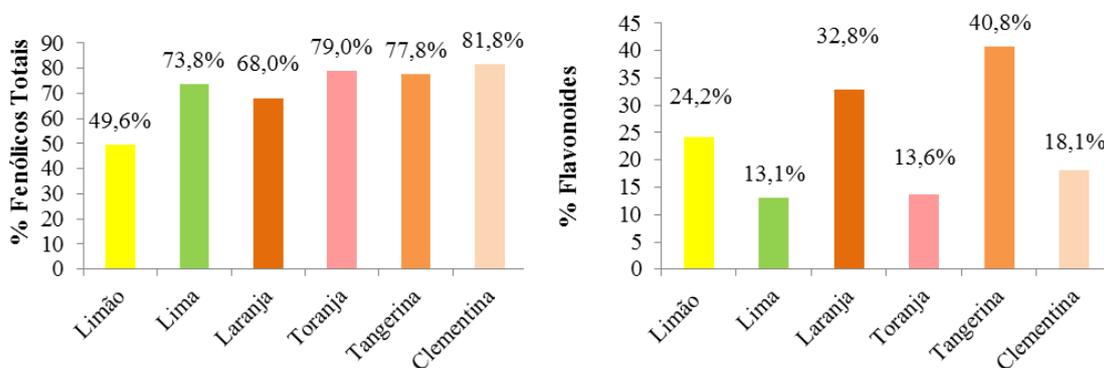
De uma maneira geral, este estudo mostrou que as cascas e as polpas dos citrinos contêm grandes quantidades de fenólicos totais, teores moderados de flavonoides e uma considerável atividade antioxidante. As cascas dos frutos estudados apresentaram maior riqueza em compostos bioativos e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante, seguindo uma tendência concordante com os dados publicados por Guimarães *et al.* (2010).

De todos os frutos analisados, as cascas da tangerina e da clementina foram os resíduos que mostraram ser fontes promissoras de reutilização tanto para a indústria alimentar como farmacêutica.

Os compostos fenólicos totais apresentaram uma maior tendência para a atividade antioxidante exibida tanto nas cascas como nas polpas dos 6 frutos estudados, verificando-se uma correlação positiva de  $r^2 = 0,6188$  e  $r^2 = 0,5383$ , respetivamente. Os flavonoides, contrariamente ao espetável, apresentaram fraca correlação com a atividade antioxidante com valores de  $r^2 = 0,1460$  e  $r^2 = 0,1886$  para as cascas e polpas, respetivamente. Assim, sugere-se que outros compostos bioativos (não-flavonoides), tais como os carotenoides, taninos e ácidos fenólicos possam participar no aumento da atividade antioxidante dos subprodutos cítricos estudados. Kuda e Ikemori (2009)

defendem que outros compostos hidrofílicos como os péptidos e vitaminas também possam influenciar a atividade antioxidante.

Torna-se importante realizar o aproveitamento das cascas dos diferentes citrinos uma vez que estas apresentam uma maior atividade antioxidante bem como maior concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides totais. De facto, através dos resultados obtidos neste estudo, verificou-se que a reutilização destes resíduos alimentares são uma fonte promissora de compostos bioativos. Os principais motivos que reduzem a ingestão das partes não convencionais dos alimentos são o desconhecimento dos princípios nutritivos e, também, a importância do aproveitamento integral dos alimentos, o que eleva o desperdício por parte da população em geral. De facto, este estudo foi interessante para dar a conhecer a importância do reaproveitamento dos resíduos alimentares, uma vez que, o teor de compostos bioativos estão maioritariamente concentrados nas cascas dos frutos. A Figura 16 resume, em valor percentual, as perdas de fenólicos totais e de flavonoides face ao desaproveitamento das cascas destes citrinos.



**Figura 16**-Porcentagem dos teores de fenólicos totais e de flavonoides desperdiçados aquando do não reaproveitamento das cascas dos citrinos estudados

#### 5.4. Análise sensorial

Atendendo à riqueza em fitoquímicos presentes nas cascas dos citrinos, e como alternativa ao reaproveitamento das mesmas, neste trabalho, foram realizados biscoitos enriquecidos com as cascas de limão, laranja, lima, clementina, toranja e tangerina de origem portuguesa. Ainda, na casca dos alimentos pode-se encontrar as fibras alimentares (FA), constituídas de polissacarídeos, lignina, celulose e hemicelulose.

Evidências indicam que a pectina, um polissacarídeo estrutural, funciona como um agente hidratante e material de cimentação para a rede de celulose, além de múltiplas atividades biológicas, incluindo o controle de glicemia e colesterol. As fibras também exercem um papel importante em relação à manutenção do peso e na redução do risco de obesidade. Uma alternativa para o aproveitamento de alimentos é o desenvolvimento de produtos de panificação, como biscoitos, pães e massas alimentícias, adicionados com farinhas de cascas de frutas para o aproveitamento integral, ampliando assim a oferta de novos produtos alimentares com alto teor de fibra, tanto para o consumidor normal, como para aqueles que apresentem certas doenças.

Crê-se que o biscoito tipo “amanteigado” é bastante aceito pela população em geral, não só pela sua aparência atrativa, como também pelo facto de ser um alimento fácil de ser enriquecido.

Diante do exposto, um outro objetivo deste estudo foi avaliar o grau de aceitabilidade sensorial de 6 biscoitos enriquecidos com cada casca dos frutos estudados.

Com a possível aceitação destes alimentos pelo consumidor, será interessante progredir o estudo para a total caracterização das espécies estudadas e avaliar as possibilidades da sua introdução na dieta alimentar. Desta forma, poder-se-iam aproveitar os recursos naturais existentes, promovendo uma exploração sustentável destas espécies nacionais e dar resposta à necessidade crescente de fontes alimentares.

A avaliação sensorial foi realizada no Laboratório de Bromatologia, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa. Participaram da pesquisa 150 provadores não treinados, incluindo estudantes e funcionários da Faculdade de ambos os sexos assim como público externo.

Os provadores avaliaram as amostras de forma monádica sequencial, usando uma escala de pontuação de Likert com 9 categorias, de extremamente agradável a extremamente desagradável. As amostras foram também avaliadas em relação à intenção de compra (“compraria este produto?”). A análise de dados foi realizada usando o programa IBM

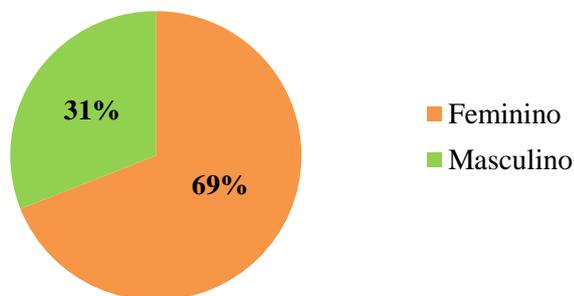
SPSS STATISTICS, 22.0 (IBM Corporation, New York, USA (2015)). Os resultados forma descritos através de contagens e respectivas percentagens para variáveis qualitativas nominais e ordinais, e ainda pelo cálculo da média e desvio padrão para os resultados da apreciação da aparência, aroma e sabor (escala de Likert) para comparação com resultados de outros trabalhos.

Pelos testes sensoriais dos produtos foram avaliados os atributos: “aparência”, “aroma”, “sabor”, através de um inquérito anónimo e individual (ANEXO I).

.Os dados foram testados quanto à normalidade da distribuição e à homogeneidade de variâncias dos grupos, utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respetivamente. Os critérios da aplicação de ANOVA não se concretizaram e a análise de comparação da apreciação de aparência, aroma e sabor dos 6 biscoitos (todos os provadores, ou subdividido por faixa etária ou por género) foi realizada através de testes não-paramétricos, do teste de Friedman, e detetando-se diferenças significativas estas foram identificadas através do teste de Wilcoxon. A análise de padrão de apreciação de determinado biscoito por grupo independente de faixa etária ou por género foi realizada com os testes de Kruskal-Wallis ou de Mann-Whitney. Por fim, a comparação de intenção de compra foi realizada através de testes de qui-quadrado.

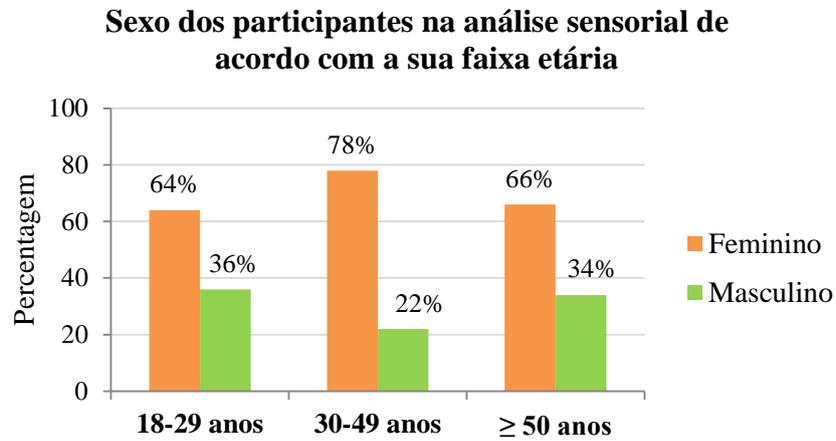
Neste estudo participaram ao todo 150 provadores não treinados, sendo a 104 pessoas do sexo feminino (69%) e 46 do sexo masculino (31%). Desta forma, a maioria dos participantes foram do sexo feminino (Figura 17).

#### Sexo dos participantes na análise sensorial



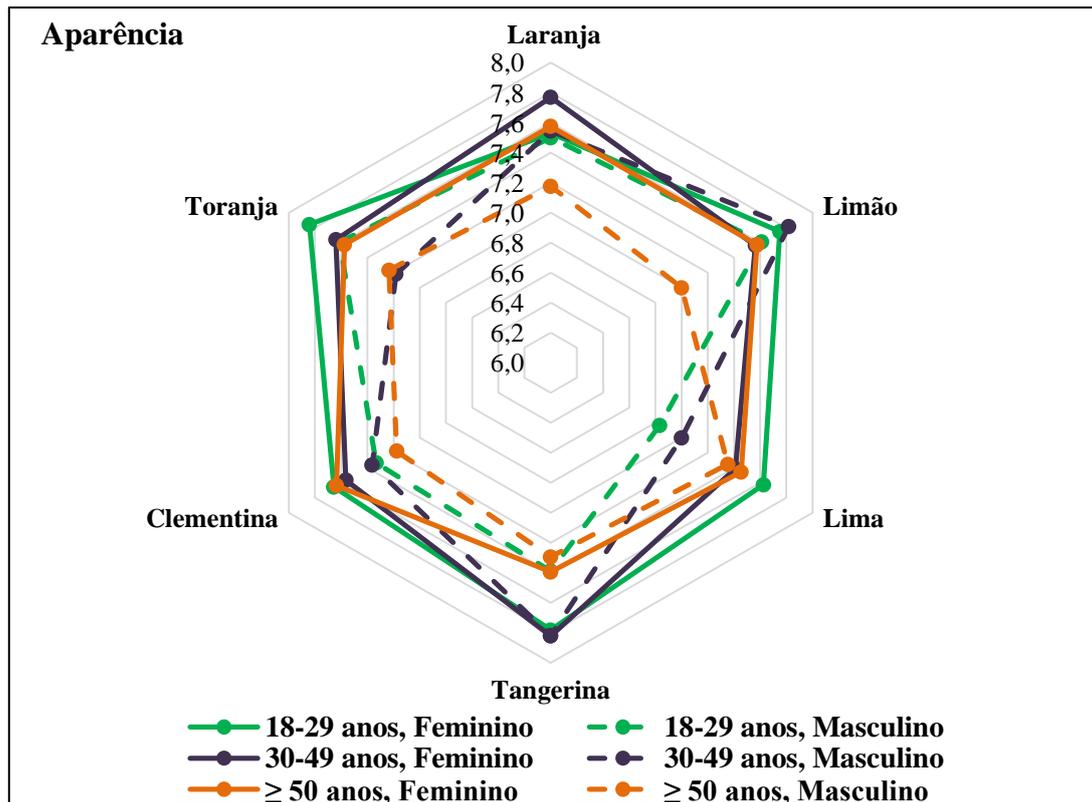
**Figura 17-**Percentagem de participantes relativamente ao género

De acordo com os três grupos etários, constituídos por 50 elementos cada, verificou-se que em todos os grupos houve mais participantes do gênero feminino, sendo que a faixa etária dos 30 a 49 anos foi a mais elevada para as mulheres (78%) do que no gênero masculino (22%) (Figura 18).



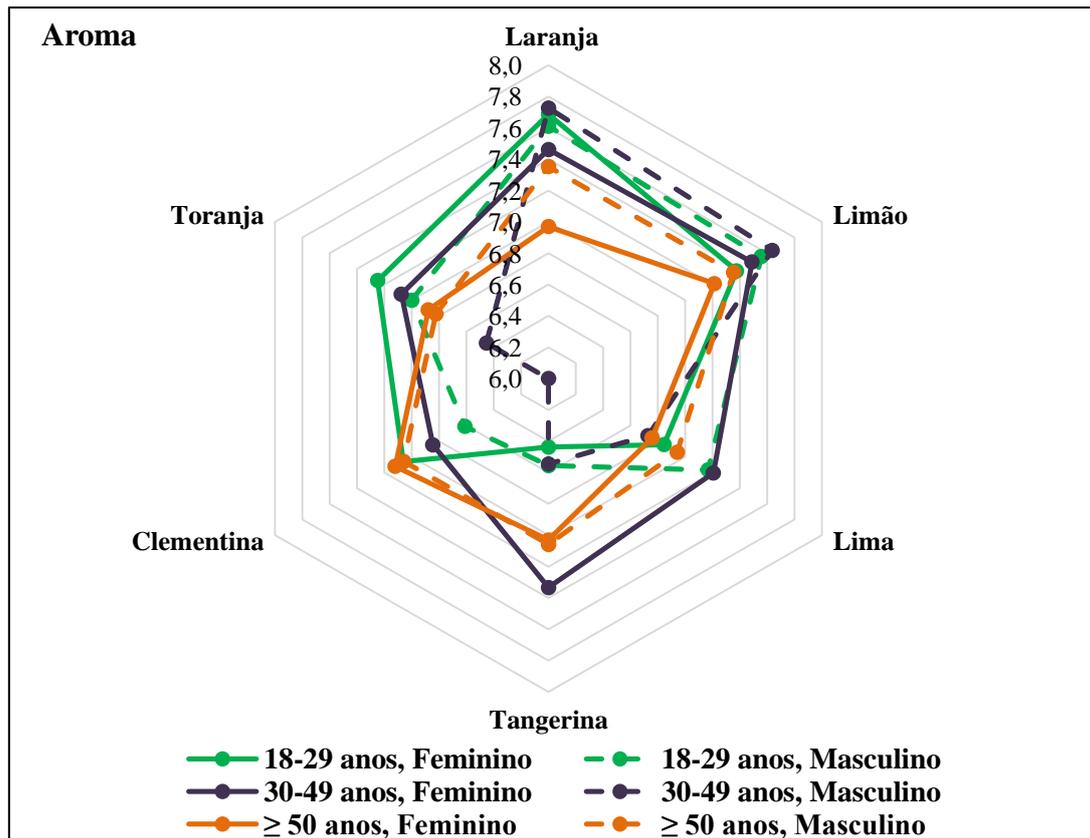
**Figura 18**-Porcentagem de participantes da análise sensorial do sexo feminino e masculino de acordo com a sua faixa etária

Relativamente aos três parâmetros avaliados para os 6 biscoitos em estudo, os mesmos estão representados em diagrama de teia (Figuras 19, 20 e 21).



**Figura 19**-Diagrama teia de aranha relativo às médias da avaliação da aparência de acordo com sexo e faixa etária

Quanto à aparência não foram detetadas diferenças significativas na apreciação dos seis biscoitos por faixa etária ou sexo (as médias variaram de 6,8 a 7,8). No geral os participantes do sexo feminino deram avaliações mais positivas relativamente aos do sexo masculino, com exceção do biscoito de limão (Figura 19).



**Figura 20**-Diagrama teia de aranha relativo às médias da avaliação do aroma de acordo com sexo e faixa etária

Em relação ao aroma dos biscoitos este foi apreciado de forma significativamente diferente pelos provadores das duas faixas etárias mais jovens. O grupo etário dos mais velhos (50-70 anos) avaliou o aroma dos diferentes biscoitos com poucas variações (entre 6,8 e 7,4) independentemente do sexo do participante. Enquanto na faixa dos 18 aos 29 anos e na dos 30 aos 49 anos as diferenças entre sexos foi mais acentuada, como no caso da clementina em que as mulheres apreciaram mais o seu aroma em relação aos homens. Neste último grupo etário também existiu uma discrepância entre a avaliação do aroma dos biscoitos de tangerina, na qual mais uma vez as mulheres apreciaram mais este aroma (Figura 20).

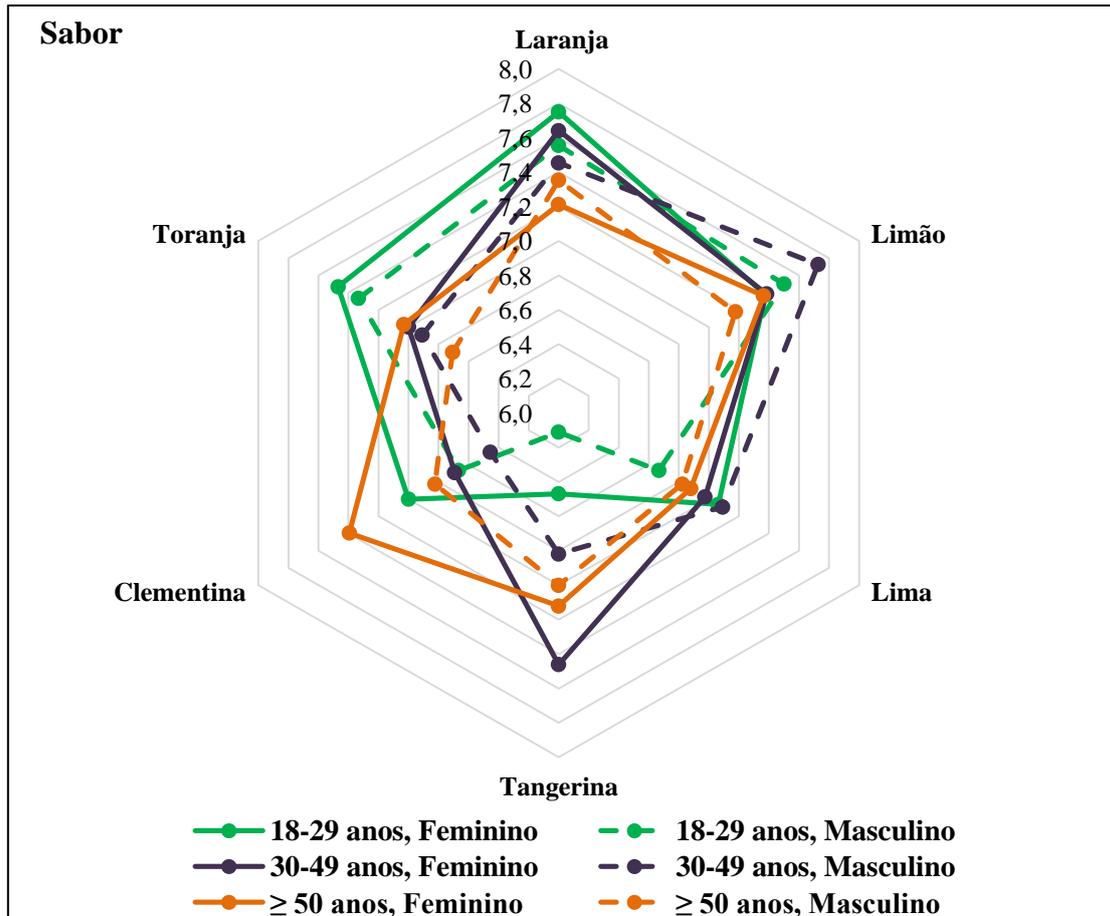


Figura 21-Diagrama teia de aranha relativo às médias da avaliação do sabor de acordo com sexo e faixa etária

O sabor dos biscoitos foi avaliado de diferente forma consoante a faixa etária e o género. Como se pode observar na Figura 21, o sabor dos biscoitos teve avaliações discrepantes, desde 6 a 7,5 na tangerina ou 6,3 a 7,4 no caso da clementina, sendo menor a diferença no caso do limão, com valores a oscilar entre o 7,1 e o 7,8 e a laranja com 7,2 e 7,8 (Figura 21).

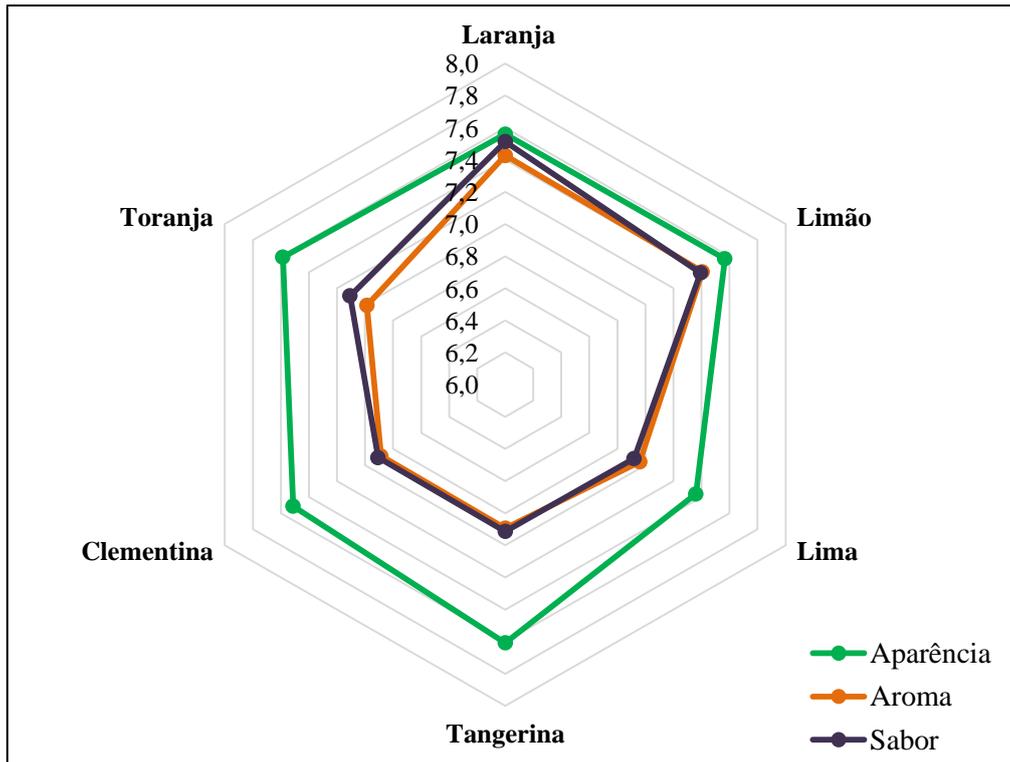
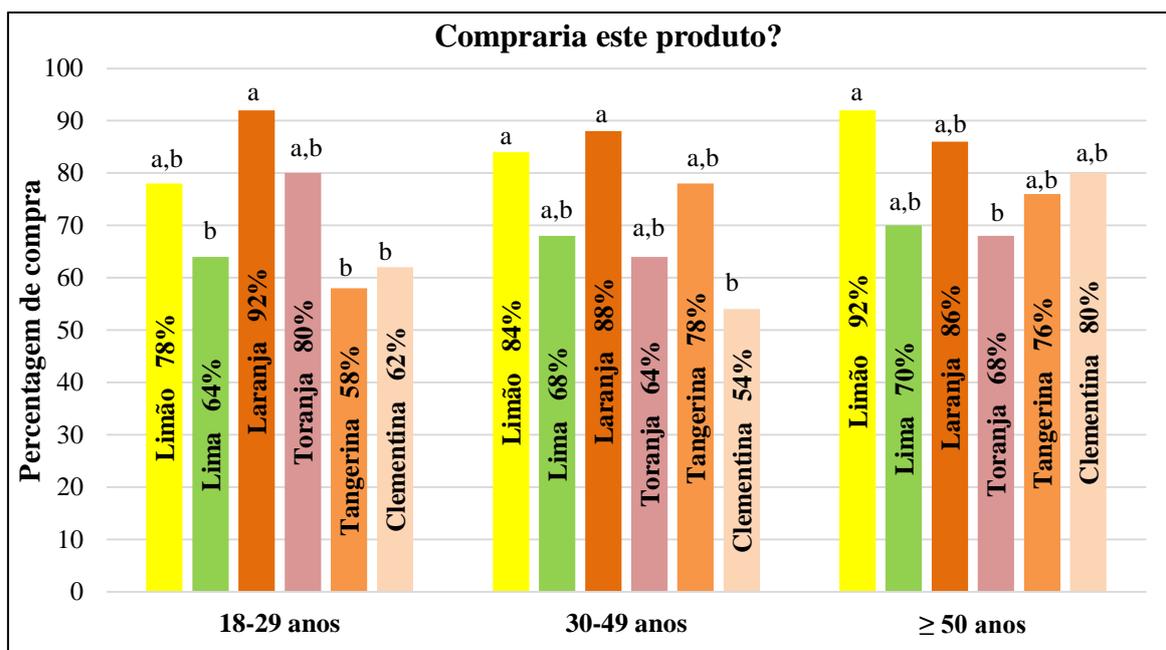


Figura 22-Diagrama teia de aranha relativo às médias da avaliação da aparência, aroma e sabor

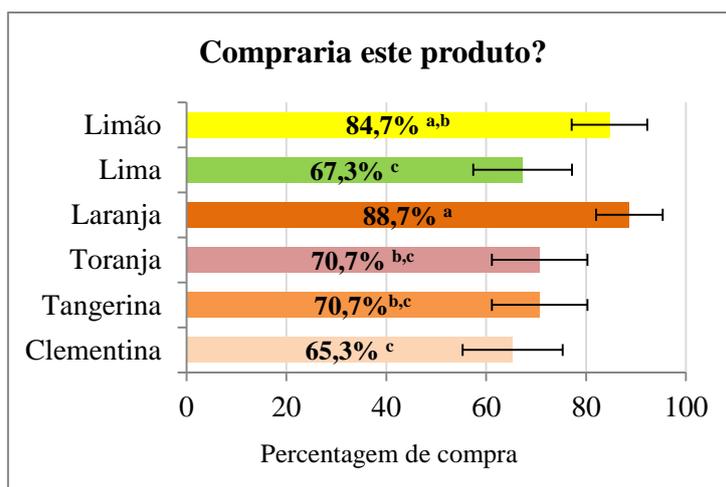
Quando se compararam os três parâmetros apreciados pelo total dos participantes, observou-se que a aparência dos biscoitos foi avaliada de forma mais positiva relativamente ao aroma e ao sabor. Verificou-se que os biscoitos de laranja e limão foram os favoritos quanto à aparência, aroma e sabor, apesar dos restantes biscoitos serem avaliados também positivamente (Figura 22).



a,b - Letras diferentes indicam diferenças significativas com relação à intenção de compra, com correção de Bonferroni.

**Figura 23-**Diagrama de barras relativo a valores de intenção de compra (%) de cada biscoito, por faixa etária.

Relativamente à intenção de compra dos participantes por faixa etária verificaram-se algumas discrepâncias (Figura 23), com a lima (64%), a clementina (62%) e a tangerina (58%) com uma intenção de compra significativamente menor para a faixa etária dos 18 aos 29 anos, a clementina (54%) com uma intenção de compra significativamente menor que os restantes sabores entre os 30 e 49 anos, e a toranja (68%) com menor intenção para o grupo etário de 50 ou mais anos. Salienta-se que a toranja apresentou uma intenção de compra que não diferiu significativamente da dos sabores tradicionais de laranja e limão entre os provadores com menos de 50 anos, mas este foi o biscoito com menor intenção de compra a partir dessa idade.



<sup>a,b,c</sup> - Letras diferentes indicam diferenças significativas com relação à intenção de compra.

**Figura 24**-Diagrama de barras relativo a valores de intenção de compra (%) de cada biscoito. Barras de erro representam o intervalo de confiança a 95% (com correção de Bonferroni).

A intenção de compra (Figura 24) é maior nos biscoitos “tradicional” de laranja (88,7%) e limão (84,7%), sendo os biscoitos de lima e clementina os que apresentam intenção de compra significativamente menor (67,3% e 65,3% respectivamente). Os biscoitos de tangerina e de toranja apresentam uma intenção de compra intermédia (70,7%) relativamente aos restantes, que apenas é significativamente inferior ao de laranja, mas não difere significativamente de todos os outros. Como verificado anteriormente os biscoitos de laranja e limão foram os favoritos quanto à sua aparência, aroma e sabor, desta forma, é normal que sejam estes dois que os participantes prefiram comprar em relação aos outros.

O desenvolvimento destes biscoitos permitiu comprovar que a adição das cascas foi bem aceite. Assim sendo, o recurso ao reaproveitamento das cascas de citrinos podem ser consideradas como potenciais ingredientes, com propriedades funcionais para a adição em biscoitos e/ou produtos de panificação e similares, podendo ser oferecidos aos consumidores com altas expectativas de aceitação no mercado.

## **CAPITULO VI. CONCLUSÃO**

O constante crescimento da população acarreta o problema da produção de alimentos. Desta forma, verifica-se uma necessidade cada vez maior da indústria agroalimentar adequar os seus processos, de forma a contribuir positivamente para a sustentabilidade, realizando a gestão dos subprodutos.

A ciência e tecnologia possibilitam a resolução de muitos dos problemas desta indústria através da informação que fornecem, permitindo atribuir valor e retirar proveito dos resíduos produzidos como fonte de compostos funcionais. A tecnologia de processamento dos alimentos pode ainda ser otimizada, de forma a minimizar a quantidade de resíduos produzidos.

Atualmente, já se encontram diversos exemplos da valorização de subprodutos, sendo que alguns já se aplicam em algumas indústrias enquanto que outros são fruto da investigação atual e futura e ainda não foram postos em prática. É necessário avaliar convenientemente os casos de valorização de subprodutos que a comunidade científica apresenta, pois é possível que nem todos sejam viáveis a nível económico e social.

Os resultados revelam que a casca e polpa, principalmente a casca, de frutas cítricas produzidas em território nacional são fontes valiosas de componentes bioativos, desta forma, estes podem ser considerados para uso na formulação de produtos alimentares com o objetivo de aumentar os benefícios para a saúde dos alimentos, tal como um maior potencial antioxidante.

## CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFIA

Abdullah, N. *et al.* (2012). Assessment on the antioxidant and antibacterial activities of selected fruit peels. *International Journal of ChemTech Research*, 4(4), pp. 1534-1542.

Abeyasinghe, D. C. *et al.* (2007). Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*, 104(4), pp. 1338-1344.

Abirami, G. S. K. e Nirmala, P. (2013). A comparative phytochemical and anti-bacterial study of Menthapiperita and Citrus sinensis. *International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology*, 3(2), pp. 103-105.

Ahmad, S. R. *et al.* (2015). Fruit based natural antioxidants in meat and meat products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, pp. 1503-1513.

Alasalvar, C. *et al.* (2009). Antioxidant activity of hazelnut skin phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp. 4645-4650.

Al-Juhaimi, F. Y. (2014). Citrus fruits by-products as sources of bioactive compounds with antioxidant potential. *Pakistan Journal of Botany*, 46(4), pp. 1459-1462.

Alquezar, B., Rodrigo, M. J. e Zacarías, L. (2008). Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. *Phytochemistry*, 69(10), pp. 1997-2007.

Álvarez, R. *et al.* (2012). Citrus juice extraction systems: effect on chemical composition and antioxidant activity of clementine juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, pp. 774-781.

Antolovich, M. *et al.* (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, pp. 183-198.

Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), pp. 419-421.

Balasundram, N., Sundram, K. e Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), pp. 191-203.

Balogh, E., Hegedús, A. e Bányai, E. S. (2010). Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. *Scientia Horticulturae*, 125(3), pp. 332-336.

Barba, A. *et al.* (2006). Application of a UV–vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95(2), pp. 328-336.

Barros, H. R. M, Ferreira, T. A. C. e Genovese, M. I. (2012). Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*, 134(4), pp. 1892-1898.

Bermejo, A. e Cano, A. (2012). Analysis of nutritional constituents in twenty citrus cultivars from the mediterranean area at different stages of ripening. *Food and Nutrition Sciences*, 3, pp. 639-650.

Boudries, H. *et al.* (2012). Pulp antioxidant activities, mineral contents and juice nutritional properties of algerian clementine cultivars and mandarin. *African Journal of Biotechnology*, 11(18), pp. 4258-4267.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. e Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science Technology*, 28(1), pp. 25-30.

Buettner *et al.* (2003). Evaluation of the most odour-active compounds in the peel oil of clementines (*citrus reticulata blanco* cv. clementine). *European Food Research and Technology*, 216, pp. 11-14.

Burgos, G. *et al.* (2012). Carotenoid concentrations of native Andean potatoes as affected by cooking. *Food Chemistry*, 133(4), pp. 1131-1137.

Cardenosa, V. *et al.* (2015). Different Citrus rootstocks present high dissimilarities in their antioxidant activity and vitamins content according to the ripening stage. *Journal of Plant Physiology*, 174, pp. 124-130.

- Cartea, M. E. *et al.* (2011). Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules*, 16, 251-280.
- Casquete, R. *et al.* (2015). Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *in press*.
- Chakraborty, P. *et al.* (2009). Role of antioxidants in common health diseases. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2(2), pp. 238-244.
- Chao, C. C. T. (2005). Pollination study of mandarins and the effect on seediness and fruit size: implications for seedless mandarin production. *HortScience*, 40(2), pp. 362-365.
- Chede, P. S. (2013). Phytochemical analysis of *Citrus sinensis* peel. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(1), pp. 339-343.
- Chedea, V. S., Kefalas, P. e Socaciu, C. (2010). Patterns of carotenoid pigments extracted from two orange peel wastes (Valencia and Navel var.). *Journal of Food Biochemistry*, 34(1), pp. 101-110.
- Claro, P. B. O., Claro, D. P. e Amâncio, R. (2008). Entendendo o conceito de sustentabilidade nas organizações. *Revista de Administração da Universidade de São Paulo*, 43(4), pp. 289-300.
- Comissão Nacional da UNESCO. [Em linha]. Disponível em <<https://www.unescoportugal.mne.pt/pt/noticias/324-dieta-mediterranica-na-lista-do-patrimonio-imaterial>>. [Consultado em 14/09/15].
- Contini, M. *et al.* (2008). Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry*, 110, pp. 659-669.
- Costa, A. S. G. *et al.* (2014). Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*, 53, pp. 350-357.

Degáspari, C.H. e Waszczyński, N. (2004). Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, 5(1), pp. 33-40.

Duarte, A. M. M. (2012). Breves notas sobre a citricultura portuguesa, *Agrotec*, 3, pp. 40-41.

Dubick, M. A. e Omaye, S. T. (2001). Modification of atherogenesis and heart disease by grape wine and tea polyphenols. In: Wildman, R. E. C. (Ed.). *Handbook of Nutraceutical and Functional Food*. Nova Iorque, CRC Press, pp. 143-153.

Egea, I. *et al.* (2010). Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, pp. 121-129.

Faleye, F. J., Ogundaini, A. O. e Olugbade, A. T. (2012). Antibacterial and antioxidant activities of *Citrus paradisi* (grapefruit seed) extracts. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 1(3), pp. 63-66.

FAO, Food and Agriculture Organization (2014) [Em linha]. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. [Consultado em 12/01/15].

FAO, Crop prospects and food situation, No.1. 2015. [Em linha]. Disponível em <<http://www.fao.org/3/a-I4410E.pdf>>. [Consultado em 15/08/15].

FAO, Nutritional and health benefits of citrus fruits. [Em linha]. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/x2650t/x2650t03.htm>>. [Consultado em 15/08/15].

Falguera, V., Aliguer, N. e Falguera, M. (2012). An integrated approach to current trends in food consumption: Moving toward functional and organic products? *Food Control*, 26, pp. 274-281.

Fiedor, J. e Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6, pp. 466-488.

Freitas, N. S. (2008). Coleta e reciclagem de óleo de fritura: saiba como contribuir com o meio ambiente e ainda ganhar em troca. In: Menecucci, R. Gões e Coelho, R. P. (Ed.). *Recóleo*. Belo Horizonte, MG, pp. 3-6.

Fu, S. *et al.* (2010). Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, pp. 643-654.

Gattuso, G. *et al.* (2007). Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*, 12, pp. 1641-1673.

Gengaihi S. E. *et al.* Antioxidant activity of phenolic compounds from different grape wastes. *Journal of Food Processing & Technology*, 5(2), pp. 1-5.

Ghafar, M. F. A. *et al.* (2010). Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from citrus species. *African Journal of Biotechnology*, 9(3), pp. 326-330.

Ghasemi, K., Ghasemi, Y. e Ebrahimzadeh, M. A. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(3), pp. 277-281.

Gnanasaraswathi, M. *et al.* (2014). Potent anti-oxidant behavior of citrus fruit peels and their bactericidal activity against multi drug resistant organism *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 2, pp. 139-144.

Goli, A. H., Barzegar, M. e Sahari, M. A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92, pp. 521-525.

Goulas, V. e Manganaris, G. A. (2012). Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of citrus fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry*, 131(1), pp. 39-47.

Guimarães, R. *et al.* (2010). Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), pp. 99-106.

Hajimahmoodi, M. *et al.* (2014). Total antioxidant activity, and hesperidin, diosmin, eriocitrin and quercetin contents of various lemon juices. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(6), pp. 951-956.

Hazewindus, M. *et al.* (2012). The anti-inflammatory effect of lycopene complements the antioxidant action of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol. *Food Chemistry*, 132, pp. 954-958.

Hegazy, A. E. e Ibrahim, M. I. (2012). Antioxidant activities of orange peel extracts. *World Applied Sciences Journal*, 18(5), pp. 684-688.

Huang, D., Ou, B. e Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), pp. 1841-1856.

INE, *Estatísticas Agrícolas - 2014*. [Em linha]. Disponível em <[https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOESpub\\_boui=224773630&PUBLICACOESmodo=2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=224773630&PUBLICACOESmodo=2)> [Consultado em 25/08/14].

Jasim, A. R. (2012). Phytochemical study of some flavonoids present in the fruit peels of *Citrus reticulata* grown in Iraq. *Kerbala Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, pp. 136-151.

Kato, M. *et al.* (2004). Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology*, 134(2), pp. 824-837.

Kennedy, D. O. e Wightman, E. L. (2011). Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition*, 2(1), pp. 32-50.

Khan, R. A. e Riaz, A. (2015). Behavioral effects of citrus limon in rats. *Metabolic Brain Disease*, 30, pp. 589-596.

Khonkarn, R. *et al.* (2010). Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 48, pp. 2122-2129.

- Kumar, S. (2011). Free radicals and antioxidants: human and food system. *Advances in Applied Science Research*, 2(1), pp. 129-135.
- Kunwar, A. e Priyadarsini, K. I. (2011). Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical & Allied Sciences*, 1(2), pp. 53-60.
- Lacerda, C. S. e Cândido, G. A. (2013). Modelos de indicadores de sustentabilidade para gestão de recursos hídricos. In: Lira, S. W. e Cândido, G. A. (Ed.). *Gestão Sustentável dos Recursos Naturais: Uma Abordagem Participativa*. Campina Grande, Editora da Universidade Estadual da Paraíba, p. 14.
- Lam, R. Y. Y. *et al.* (2007). Antioxidant actions of phenolic compounds found in dietary plants on low-density lipoprotein and erythrocytes *in vitro*. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(3), pp. 233-242.
- Locatelli, M. *et al.* (2010). Total antioxidant activity of hazelnut skin (Nocciola Piemonte PGI): Impact of different roasting conditions. *Food Chemistry*, 119, pp. 1647-1655.
- Lorente, J. *et al.* (2014). Chemical guide parameters for Spanish lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.) juices. *Food Chemistry*, 162, pp. 186-191.
- Mabberley, D. J. (1997). A classification for edible *citrus* (Rutaceae). *Telopea*, 7(2), pp. 167-172.
- Madhuri, S. *et al.* (2014). Antimicrobial activity of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* peel extracts. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 3(4), pp. 366-368.
- Makris, D. P., Boskou, G. e Andrikopoulos, N. K. (2007). Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, pp. 125-132.
- Malik, K., Tokkas, J. e Goyal, S. (2012). Microbial pigments: A review. *International Journal of Microbial Resource Technology*, 1(4), pp. 361-365.

- Mamma, D., Kourtoglou, E. e Christakopoulos, P. (2008). Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, 99(7), pp. 2373-2383.
- Mathew, B. B., Jatawa, S. K. e Tiwari, A. (2012). Phytochemical analysis of *Citrus limonum* pulp and peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2), pp. 269-371.
- Mohammadian, M. A., Mobrami, Z. e Sajedi, R. H. (2011). Bioactive compounds and antioxidant capacities in the flavedo tissue of two citrus cultivars under low temperature. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23(3), pp. 203-208.
- Mohammed, Q. Y., Hamad, W. M. e Mohammed, E. K. (2009). Spectrophotometric determination of total vitamin C in some fruits and vegetables at Koya area – Kurdistan region/ Iraq. *Journal of Kirkuk University*, 4(2), pp. 46-54.
- Molina, E. G. *et al.* (2010). Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), pp. 327–345.
- Montazeri, N. *et al.* (2011). Phytochemical contents and biological activities of *Rosa canina* fruit from Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18), pp. 4584-4589.
- Mortensen, A. (2006). Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure Applied Chemistry*, 78(8), pp. 1477-1491.
- Moure, A. *et al.* (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), pp. 145-171.
- Mussa, S. B. e Sharaa, I. E. (2014). Analysis of vitamin C (ascorbic acid) contents packed fruit juice by UV-spectrophotometry and redox titration methods. *Journal of Applied Physics*, 6(5), pp. 46-52.
- Nakajima, V. M., Macedo, G. A. e Macedo, J. A. (2014). Citrus bioactive phenolics: Role in the obesity treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 59, pp. 1205-1212.
- Nicolosi, E. (2007). Origin and Taxonomy. In: Khan, I. A. (Ed.). *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. Cambridge, CAB International, pp. 27-39.

- Oliveira, A. C. *et al.* (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32(3), pp. 689-702.
- Ortiz, J. M. (2002). Botany: taxonomy, morphology and physiology of fruits, leaves and flowers. In: Dugo, G. e Giacomo, A.D. (Ed.). *Citrus: The Genus Citrus*. Londres, CRC Press, pp. 16-21.
- Pala, F. S. e Gürkan, H. (2008). The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Advances in Molecular Biology*, 1, pp. 1-9.
- Pandey, K. B. e Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), pp. 270-278.
- Parashar, S., Sharma, H. e Garg, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant activities of fruits and vegetable peels: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(1), pp.160-164.
- Pereira, A. P. *et al.* (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12, pp. 1153-1162.
- Peterson, J. J. *et al.* (2006). Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, pp. 66-73.
- Pinelo, M. *et al.* (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*, 85, pp. 267-273.
- Pinto L. (2003). Azeite e Ambiente, *Voz da Terra*, 30, pp. 12-18.
- Poiroux-Gonord, F. *et al.* (2012). Effect of fruit load on maturity and carotenoid content of clementine (*Citrus clementina* Hort.ex Tan.) fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, pp. 2076-2083.
- Pyrzynska, K. e Pełkal, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 5, pp. 4288-4295.

Quirós, A. R. B., Yusty, M. L. e Hernández, J. L. (2010). Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chemistry*, 121, pp. 634-638.

Rahman, M. M., Khan, M. M. R. e Hosain, M. M. (2007). Analysis of vitamin C (ascorbic acid) contents in various fruits and vegetables by UV-spectrophotometry. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 42(4), pp. 417-424.

Ramful, D. *et al.* (2010) Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 278(1), pp. 75-87.

Rao, A. V. e Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), pp. 207–216.

Rekha, C. *et al.* (2012). Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. *Chemical Science Transactions*, 1(2), pp. 303-310.

Rekha, S. S. e Bhaskar, M. (2013). *In vitro* screening and identification of antioxidant activities of orange (*Citrus sinensis*) peel extract in different solvents. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(4), pp. 405-412.

Rodrigo, M. J., Marcos, J. F. e Zacarías, L. (2004). Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), pp. 6724-6731.

Santhose, I. *et al.* (2011). Enhanced carotenoid synthesis of *Phormidium* sp. in stressed conditions. *Journal of Experimental Sciences*, 2(3), pp. 38-44.

Santos, R., Shetty, K. e Miglioranza, L. H. S. (2014). Oxidative stability of butter with added phenolics from Lamiaceae herbs and *in vitro* evaluation of potential cytotoxicity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 49, pp. 768-775.

Sarmadi, B. H. e Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), pp. 1949-1956.

Schieber, A., Stintzing, F. C. e Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12, pp. 401-413.

Shishehbore, M. R. e Aghamiri, Z. (2014). A highly sensitive kinetic spectrophotometric method for the determination of ascorbic acid in pharmaceutical samples. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(2), pp. 373-382.

Silva M. L. C. *et al.* (2010). Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. *Ciências Agrárias*, 31( 3), pp. 669-682.

Singanusong, R. *et al.* (2015). Low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* blanco cv. sainampung) and lime (*Citrus aurantifolia*) peels and the antioxidant. *Food Analytical Methods*, 8, pp. 1112-1123.

Sivam, G. (2002). Analysis of flavonoids. In: Hurst, W.J. (Ed.). *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*. Nova Iorque, CRC Press, p.350.

Soares, M. *et al.* (2008). Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(3), pp. 727-732.

Sousa, M. S. B. *et al.* Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. *Brazilian Journal of Food and Technology*, 14(3), pp. 202-210.

Spiertz, H. (2010). Food production, crops and sustainability: Restoring confidence in science and technology. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2, pp. 439-443.

Stahl, W. e Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), pp. 345-351.

Thorat, I. D. *et al.* (2013). Antioxidants, their properties, uses in food products and their legal implications. *International Journal of Food Studies*, 2, pp. 81-104.

Tomaino, A. *et al.* (2010). Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie*, 92, pp. 1115-1122.

Tripoli, E. *et al.* (2007). Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), pp. 466-479.

Trucom, C. (2007). Farinha de Limão. [Em linha]. Disponível em <<http://somostodosum.ig.com.br/conteudo/c.asp?id=07213>>. [Consultado em 29/09/2015].

Tsujiyama, I. *et al.* (2013). Anti-histamine release and anti-inflammatory activities of aqueous extracts of citrus fruits peels. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 13, pp. 175-180.

Uckoo, R. M. *et al.* (2012). Grapefruit (*Citrus paradisi* macfad) phytochemicals composition is modulated by household processing techniques. *Journal of Food Science*, 77(9), pp. 921-926.

Valko, M. *et al.* (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), pp. 44-84.

Vasudeva, N. e Sharma, T. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Citrus limettioides Tanaka. *Journal of Pharmaceutical Technology & Drug Research*, 1, pp. 1-7.

Vilanueva, N. D. M. (2003). *Avaliação do desempenho de quatro métodos de escalonamento em testes sensoriais de aceitação utilizando modelos normais aditivos de análise de variância e mapas internos de preferência*. Campinas, SP. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.

Vilaplana, A. G., Moreno, D. A. e Viguera, C. G. (2014). Phytochemistry and biological activity of Spanish citrus fruits. *Food & Function*, 5(4), 764-772.

Vinha, A. F. *et al.* (2015). Impact of boiling on phytochemicals and antioxidant activity of green vegetables consumed in the Mediterranean diet. *Food & Function*. 6, pp. 1157-1163.

Vinha, A. F. *et al.* (2014). Pre-meal tomato (*Lycopersicon esculentum*) intake can have anti-obesity effects in young women? *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 65(8), pp. 1019-1026.

Wang, Y. C., Chuang, Y. C. e Hsu, H. W. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 106(1), pp. 277-284.

Wognum, P. M. *et al.* (2011). Systems for sustainability and transparency of food supply chains - Current status and challenges. *Advanced Engineering Informatics*. 25, pp. 65-76.

Xi, W. *et al.* (2014). Phenolic composition of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Balnco.) pulps and their antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 52, pp. 466-474.

Xiao, J. e Högger, P. (2015). Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), pp. 23-38.

Yasoubi, P. *et al.* (2007). Total phenolic contents and antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extracts. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 9, pp. 35-42.

## **Anexos**

## **Anexo I**

Inquérito utilizado para a realização da análise sensorial

ESTUDOS COM CONSUMIDORES

Bolachas aromatizadas

DATA: \_\_\_\_\_ Sexo / gender:  F  M Idade / age: \_\_\_\_\_

Por favor prove as bolachas aromatizadas com citrinos, apresentadas e assinale com um X o grau em que aprecia a sua aparência, sabor e aroma.

	<b>APARÊNCIA</b>	<b>AROMA</b>	<b>SABOR</b>
	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável <input type="checkbox"/> Muito agradável <input type="checkbox"/> Moderadamente agradável <input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável <input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável <input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável <input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável <input type="checkbox"/> Muito desagradável <input type="checkbox"/> Extremamente desagradável	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável <input type="checkbox"/> Muito agradável <input type="checkbox"/> Moderadamente agradável <input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável <input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável <input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável <input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável <input type="checkbox"/> Muito desagradável <input type="checkbox"/> Extremamente desagradável	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável <input type="checkbox"/> Muito agradável <input type="checkbox"/> Moderadamente agradável <input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável <input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável <input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável <input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável <input type="checkbox"/> Muito desagradável <input type="checkbox"/> Extremamente desagradável
AMOSTRA _____	Compraria este produto? Sim _____ Não _____		
	<b>APARÊNCIA</b>	<b>AROMA</b>	<b>SABOR</b>
	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável <input type="checkbox"/> Muito agradável <input type="checkbox"/> Moderadamente agradável <input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável <input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável <input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável <input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável <input type="checkbox"/> Muito desagradável <input type="checkbox"/> Extremamente desagradável	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável <input type="checkbox"/> Muito agradável <input type="checkbox"/> Moderadamente agradável <input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável <input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável <input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável <input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável <input type="checkbox"/> Muito desagradável <input type="checkbox"/> Extremamente desagradável	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável <input type="checkbox"/> Muito agradável <input type="checkbox"/> Moderadamente agradável <input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável <input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável <input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável <input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável <input type="checkbox"/> Muito desagradável <input type="checkbox"/> Extremamente desagradável
AMOSTRA _____	Compraria este produto? Sim _____ Não _____		

ESTUDOS COM CONSUMIDORES

Bolachas aromatizadas

AMOSTRA \_\_\_\_\_

APARÊNCIA	AROMA	SABOR
<input type="checkbox"/> Extremamente agradável	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável
<input type="checkbox"/> Muito agradável	<input type="checkbox"/> Muito agradável	<input type="checkbox"/> Muito agradável
<input type="checkbox"/> Moderadamente agradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente agradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente agradável
<input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável
<input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável	<input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável	<input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável
<input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável
<input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável
<input type="checkbox"/> Muito desagradável	<input type="checkbox"/> Muito desagradável	<input type="checkbox"/> Muito desagradável
<input type="checkbox"/> Extremamente desagradável	<input type="checkbox"/> Extremamente desagradável	<input type="checkbox"/> Extremamente desagradável

Compraria este produto? Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_

AMOSTRA \_\_\_\_\_

APARÊNCIA	AROMA	SABOR
<input type="checkbox"/> Extremamente agradável	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável
<input type="checkbox"/> Muito agradável	<input type="checkbox"/> Muito agradável	<input type="checkbox"/> Muito agradável
<input type="checkbox"/> Moderadamente agradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente agradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente agradável
<input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável
<input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável	<input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável	<input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável
<input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável
<input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável
<input type="checkbox"/> Muito desagradável	<input type="checkbox"/> Muito desagradável	<input type="checkbox"/> Muito desagradável
<input type="checkbox"/> Extremamente desagradável	<input type="checkbox"/> Extremamente desagradável	<input type="checkbox"/> Extremamente desagradável

Compraria este produto? Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_

ESTUDOS COM CONSUMIDORES

Bolachas aromatizadas

AMOSTRA \_\_\_\_\_

APARÊNCIA	AROMA	SABOR
<input type="checkbox"/> Extremamente agradável	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável
<input type="checkbox"/> Muito agradável	<input type="checkbox"/> Muito agradável	<input type="checkbox"/> Muito agradável
<input type="checkbox"/> Moderadamente agradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente agradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente agradável
<input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável
<input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável	<input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável	<input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável
<input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável
<input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável
<input type="checkbox"/> Muito desagradável	<input type="checkbox"/> Muito desagradável	<input type="checkbox"/> Muito desagradável
<input type="checkbox"/> Extremamente desagradável	<input type="checkbox"/> Extremamente desagradável	<input type="checkbox"/> Extremamente desagradável

Compraria este produto? Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_

AMOSTRA \_\_\_\_\_

APARÊNCIA	AROMA	SABOR
<input type="checkbox"/> Extremamente agradável	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável	<input type="checkbox"/> Extremamente agradável
<input type="checkbox"/> Muito agradável	<input type="checkbox"/> Muito agradável	<input type="checkbox"/> Muito agradável
<input type="checkbox"/> Moderadamente agradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente agradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente agradável
<input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente agradável
<input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável	<input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável	<input type="checkbox"/> Nem agradável nem desagradável
<input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável	<input type="checkbox"/> Ligeiramente desagradável
<input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável	<input type="checkbox"/> Moderadamente desagradável
<input type="checkbox"/> Muito desagradável	<input type="checkbox"/> Muito desagradável	<input type="checkbox"/> Muito desagradável
<input type="checkbox"/> Extremamente desagradável	<input type="checkbox"/> Extremamente desagradável	<input type="checkbox"/> Extremamente desagradável

Compraria este produto? Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_

Obrigada pela colaboração

## **Anexo II**

Certificado e resumo científico



## CERTIFICADO

A Associação Portuguesa dos Nutricionistas certifica que no XIV Congresso de Nutrição e Alimentação, realizado nos dias 21 e 22 de Maio de 2015, no Centro de Congressos de Lisboa, foi **apresentado e discutido o seguinte poster:**

**Natural resources of phytochemical constituents in citrus fruits wastes**

Daniela Valente<sup>1</sup>, Carla Sousa<sup>1-3</sup>, Ana F Vinha<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

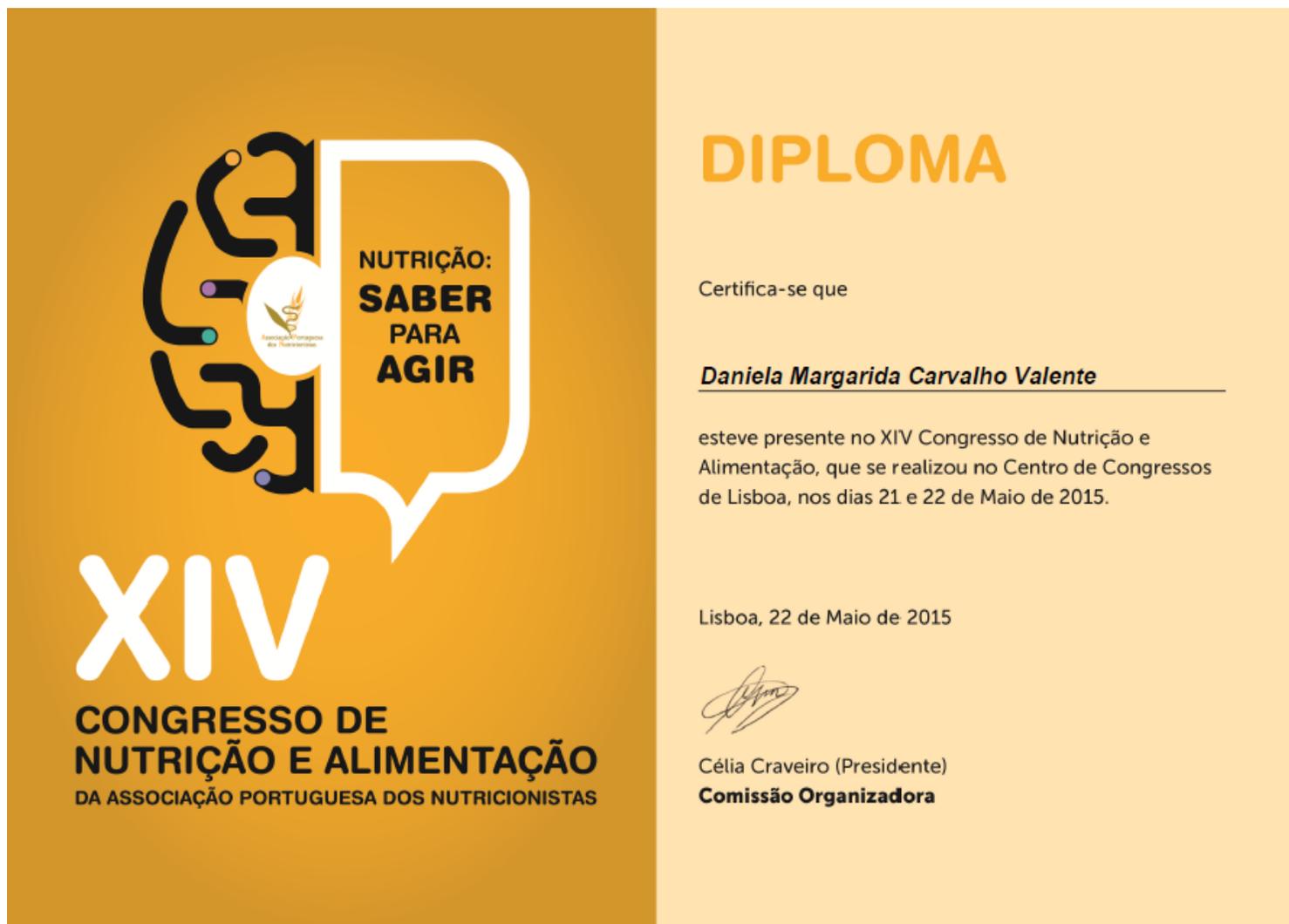
<sup>2</sup>Centro de Investigação em Biomedicina da Unidade de Investigação Fernando Pessoa em Energia, Ambiente e Saúde

<sup>3</sup>REQUIMTE do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

<sup>4</sup>LAQV-REQUIMTE da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Lisboa, 22 de Maio de 2015

Célia Craveiro (Presidente)  
Comissão Organizadora



## DIPLOMA

Certifica-se que

*Daniela Margarida Carvalho Valente*

esteve presente no XIV Congresso de Nutrição e Alimentação, que se realizou no Centro de Congressos de Lisboa, nos dias 21 e 22 de Maio de 2015.

Lisboa, 22 de Maio de 2015

Célia Craveiro (Presidente)

**Comissão Organizadora**

## Natural resources of phytochemical constituents in citrus fruits wastes

**Daniela M. C. Valente**<sup>1</sup>, Carla Sousa<sup>1,2</sup>, Ana F. Vinha<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>FP-ENAS ((Unidade de Investigação UFP em Energia, Ambiente e Saúde), CEBIMED (Centro de Estudos em Biomedicina), Fundação Fernando Pessoa), Porto, Portugal. <sup>2</sup>REQUIMTE/ Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. <sup>3</sup>LAQV-REQUIMTE/ Laboratório Associado de Química Verde, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.

### Introduction

Fruit wastes are one of the main sources of food industries. In fact, inexpensive and readily available use of agri-food industry waste is highly cost-effective and minimizes environmental impact. Due to the potential health risks of some synthetic antioxidants increasing attention is being paid to identify natural and possibly more economic and effective antioxidants.

### Objective

In order to explore the potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds in wastes (peel) of 5 citrus fruits, commonly consumed in Portugal were systematically evaluated.

### Methods

Aqueous extracts of orange, lemon, lime, grapefruit, clementine and tangerine peels were evaluated in order to their total phenolic and total flavonoid contents. A non polar solution was used to extract carotenoids, and the optical density of the supernatant at 663nm, 645nm, 505nm and 453nm were measured spectrophotometrically.

### Results

According to our results, there are certain differences in the contents of phytochemical compounds extracted from the peel of citrus fruits.

Table 1: Phytochemical constituents contents present in 5 citrus fruits peel extracts. Phenolics and flavonoids are expressed in mg/g and Lycopene and  $\beta$ -carotene in  $\mu$ g/g.

Citrus peels	Phenolics*	Flavonoids*	$\beta$ -carotene*	Lycopene*
orange	8.03 $\pm$ 0.74 <sup>c</sup>	2.56 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	0.84 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	nd
lemon	4.67 $\pm$ 0.26 <sup>e</sup>	2.81 $\pm$ 0.47 <sup>c</sup>	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	0.04 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
lime	4.39 $\pm$ 0.26 <sup>e</sup>	2.48 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>	0.75 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	nd
grapefruit	7.26 $\pm$ 0.41 <sup>d</sup>	2.10 $\pm$ 0.08 <sup>e</sup>	0.85 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	1.26 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
clementine	9.46 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	2.52 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	1.5 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	nd
tangerine	8.61 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	5.57 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	7.3 $\times$ 10 <sup>-3</sup> $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>

\*Results were expressed as mean values  $\pm$  standard deviation. Data with different letter in the same column is significantly difference at the level  $p < 0.05$ . nd: not detected.

This study showed that fruit peels contained high amount of phenolics and flavonoids that are recognized as natural antioxidants against oxidative stress and beneficial to human health as antioxidant, antibacterial, and anti-diabetic agents.

### Conclusion

Citrus fruits peels contain a large variety of bioactive components and are considered as potential sources of functional components and a valuable low cost source of health promoting constituents.

Poster n° 13, exposto no XIV Congresso Nutrição e Alimentação da Associação Portuguesa de Nutricionistas.

## Natural resources of phytochemical constituents in citrus fruits wastes

Daniela M. C. Valente<sup>1</sup>, Carla Sousa<sup>1,2,3</sup>, Ana F. Vinha<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Faculdade Ciências da Saúde- Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal; <sup>2</sup>IFP-ENAS (Unidade de Investigação UFP em Energia, Ambiente e Saúde), CEDIMED (Centro de Estudos em Biotecnologia), Fundação Fernando Pessoa, Porto, Portugal; <sup>3</sup>REQUMTE/ Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal; <sup>4</sup>LAQV-REQUMTE/ Laboratório Associado de Química Verde, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal.



Fruit wastes are one of the main sources of food industries. In fact, inexpensive and readily available use of agri-food industry waste is highly cost-effective and minimizes environmental impact. Due to the potential health risks of some synthetic antioxidants increasing attention is being paid to identify natural and possibly more economic and effective antioxidants. In order to explore the potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds in wastes (peel) of 6 citrus fruits, commonly consumed in Portugal were systematically evaluated.



Phenolics<sup>[1]</sup>

Flavonoids<sup>[2]</sup>

Carotenoids<sup>[3]</sup>

500  $\mu$ L extract  
+  
2.5 mL Folin-Ci ocalteu  
+  
2 mL NaCO<sub>3</sub> (7,5%)  
 $\lambda$  = 765 nm

1 mL extract  
+  
4 mL H<sub>2</sub>O + 300  $\mu$ L NaNO<sub>2</sub>  
+  
300  $\mu$ L AlCl<sub>3</sub> + 2 mL NaOH  
 $\lambda$  = 510 nm

1 g fruit peel  
+  
10 mL acetone+hexane (4:6)  
+  
Measurement of absorbance  
 $\lambda$  = 663, 645, 505, 453 nm

Table 1: Phytochemical contents present in 6 citrus fruits peel extracts. Phenolics and flavonoids are expressed in mg/g and Lycopene and  $\beta$ -carotene in  $\mu$ g/g.

Citrus peels	Phenolics*	Flavonoids*	$\beta$ -carotene*	Lycopene*
orange	8.03 $\pm$ 0.74 <sup>c</sup>	2.56 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	0.84 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	nd
lemon	4.67 $\pm$ 0.26 <sup>e</sup>	2.81 $\pm$ 0.47 <sup>c</sup>	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	0.04 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
lime	4.39 $\pm$ 0.26 <sup>e</sup>	2.48 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>	0.75 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	nd
grapefruit	7.26 $\pm$ 0.41 <sup>d</sup>	2.10 $\pm$ 0.08 <sup>e</sup>	0.85 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	1.26 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
clementine	9.46 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	2.52 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	1.5 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	nd
tangerine	8.61 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	5.57 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	7.3 $\times$ 10 <sup>-3</sup> $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>

\*Results were expressed as mean values  $\pm$  standard deviation. <sup>a,b,c,d,e</sup>Data with different letter in the same column is significantly difference at the level  $p < 0.05$ ; nd: not detected.

This study showed that fruit peels contained high amount of phenolics and flavonoids that are recognized as natural antioxidants against oxidative stress and beneficial to human health as antioxidant, antibacterial, and anti-diabetic agents.

### Conclusions

Citrus fruits peels contain a large variety of bioactive components and are considered as potential sources of functional components and a valuable low cost source of health promoting constituents.

#### References:

- [1] Costa AG, Alves RC, Vinha AF, Barreira SVR, Nunes MA, Cunha LM, Oliveira MBPP. 2014. Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*, 53: 350-357.
- [2] Vinha AF, Alves RC, Barreira SVR, Costa AG, Oliveira MBPP. 2015. Impact of boiling on phytochemicals and antioxidant activity of green vegetables consumed in the Mediterranean diet. *Food Funct*, 6: 1157-1163.
- [3] Vinha AF, Alves RC, Barreira SVR, Castro A, Costa AG, Oliveira MBPP. 2014. Effect of peel and seed removal on the nutritional value and antioxidant activity of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) tubs. *LWT - Food Sci Technol*, 55(1): 197-202.

**APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE POSTERS**  
**XIV Congresso de Nutrição e Alimentação da APN**

**Dia 22 de Maio**  
**08h30-09h00**  
**Sala 1.15**

**PO1**

**Refeições escolares- programas governamentais no Brasil e em Portugal**

Margareth Xavier da Silva<sup>1</sup>, Margarida Liz Martins<sup>2,3</sup>, Anna Paola Pierucci<sup>1</sup>, Cristiana Pedrosa<sup>1</sup>, Ada Rocha<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Alimentos para Fins Especiais e Educacionais do Departamento de Nutrição Básica e Experimental do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro

<sup>2</sup>LAQV-REQUIMTE da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

<sup>3</sup>Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

**PO2**

**Avaliação de projectos de promoção da saúde ao nível local - a Rede Portuguesa de Cidades Saudáveis**

Ana Rito<sup>1</sup>, Rita Garcia<sup>1</sup>, Emilia Alves<sup>1</sup>, Mirieme Ferreira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudos e Investigação em Dinâmicas Sociais e Saúde

<sup>2</sup>Rede Portuguesa de Cidades Saudáveis

**PO3**

**Como estão os portugueses em termos de consumo de pescado?**

Isabel Tato<sup>1</sup>, Sara Santos<sup>2</sup>, Leonor Lopes<sup>2</sup>, Sílvia Rodrigues<sup>2</sup>, Manuela Pintado<sup>3</sup>, Elisabete Pinto<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Associação Nacional dos Industriais das Conservas de Peixe

<sup>2</sup>Colégio de Gaia

<sup>3</sup>Centro de Biotecnologia e Química Fina da Escola Superior de Biotecnologia do Centro Regional do Porto da Universidade Católica Portuguesa

<sup>4</sup>Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto

**PO4**

**Desmistificar ideias feitas. A verdade está nos rótulos!**

Mayumi Delgado<sup>1</sup>, Teresa Herédia<sup>2</sup>, Joana Vitorino<sup>2</sup>, Teresa Paiva<sup>2</sup>, Joana Gonçalves<sup>3</sup>, Teresa Santos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sonae Modelo Continente

<sup>2</sup>Nutrialma

<sup>3</sup>Universidade Atlântica

**PO5**

**Rastreio nutricional em adolescentes portugueses**

Rita Magalhães<sup>1</sup>, Ana Nobre<sup>2</sup>, Inês Panão<sup>3</sup>, Clara Salvador<sup>3</sup>, Marta Carrilho<sup>2</sup>, Bruno Pereira<sup>4</sup>, Paula Pereira<sup>3</sup>, Filipa Vicente<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior de Biotecnologia do Centro Regional do Porto da Universidade Católica Portuguesa

<sup>2</sup>Escola Superior de Saúde da Universidade do Algarve

<sup>3</sup>Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Cooperativa de Ensino Superior

<sup>4</sup>Centro Desportivo Nacional do Jamor do Instituto Português do Desporto e da Juventude

**PO6**

**Which nutritional parameters best predict survival in hemodialysis patients?**

TeIma Oliveira<sup>1</sup>, Ana Valente<sup>1</sup>, Cristina Caetano<sup>1</sup>, Cristina Garagarza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NephroCare

#### PO7

##### **Pontos de corte do ângulo de fase para o rastreio da desnutrição na admissão hospitalar**

Rita S Guerra<sup>1,3</sup>, Ana S Sousa<sup>1,4</sup>, Isabel Fonseca<sup>3</sup>, Fernando Pichel<sup>3</sup>, Maria T Restivo<sup>2</sup>, Teresa F Amaral<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

<sup>2</sup>Unidade de Integração de Sistemas e Processos Automatizados do Instituto de Engenharia Mecânica e Gestão Industrial da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

<sup>3</sup>Serviço de Nutrição e Alimentação do Centro Hospitalar do Porto

<sup>4</sup>Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

#### PO8

##### **Modelo de prestação de cuidados de nutrição no âmbito da diabetes**

Maria João Vieira<sup>1</sup>, Isabel Paiva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidade de Recursos Assistenciais Partilhados do Agrupamento de Centros de Saúde Grande Porto VI - Porto Oriental

#### PO9

##### **Risco de desnutrição e excesso de peso/obesidade em doentes internados num Serviço de Pneumologia**

Isabel Maia<sup>1</sup>, Sónia Xará<sup>2</sup>, Daniel Vaz<sup>3</sup>, Teresa Shiang<sup>3</sup>, Teresa F Amaral<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Mestrado em Epidemiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

<sup>2</sup>Serviço de Nutrição e Dietética do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho

<sup>3</sup>Serviço de Pneumologia do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho

<sup>4</sup>Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

#### PO10

##### **Avaliação do grau de desnutrição dos doentes internados no Hospital Distrital de Santarém (Medicina IV)**

Ana Catarina Correia<sup>1</sup>, Cláudia Pereira<sup>1</sup>, José Santo Amaro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Nutricionista

<sup>2</sup>Serviço de Alimentação e Dietética do Hospital Distrital de Santarém

#### PO11

##### **Nutritional genomics: a survey to identify knowledge, interest, and continuing education needs among Swiss and Portuguese nutritionists and dietitians**

Leila Sadeghi<sup>1</sup>, Rute Espanhol<sup>2</sup>, Daniela Prozorovskaia<sup>2</sup>, Susanne Müller<sup>1</sup>, Nuno Borges<sup>2</sup>, Helena Jenzer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bern University of Applied Sciences, Health Division, aR&D Nutrition and Dietetics

<sup>2</sup>Faculty of Nutrition and Food Sciences of the University of Porto

#### PO12

##### **Nutritional composition of two Mexican products for alfalfa beverages preparation**

Guadalupe Zarazúa<sup>1,2</sup>, Anabela Guedes Costa<sup>1</sup>, Francisca Rociques<sup>1</sup>, Mamadou Moustapha Bah<sup>2</sup>, M Beatriz PP Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>REQUIMTE do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

<sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Químico Biológicas de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro de Centro Universitario Cerro de las Campanas

#### PO13

##### **Natural resources of phytochemical constituents in citrus fruits wastes**

Daniela Valente<sup>1</sup>, Carla Sousa<sup>2,3</sup>, Ana F Vinha<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Faculdade Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

<sup>2</sup>Centro de Investigação em Biomedicina da Unidade de Investigação Fernando Pessoa em Energia, Ambiente e Saúde

<sup>3</sup>REQUIMTE do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

<sup>4</sup>LAQV-REQUIMTE da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto