



**Aproveitamento de compostos fenólicos de bio resíduos de diferentes variedades de casca de kiwi**

**Murilo Esteves Dias**

*Revisão bibliográfica apresentada no Instituto Politécnico de Bragança para a obtenção do grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por:

**Doutora Lillian Barros**

**Profª Doutora Isabel C. F. R. Ferreira**

**Profº Doutor Ilton José Baraldi**

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri

**Bragança**

**2019**



Este trabalho foi financiado pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal através do projeto 0377\_Iberphenol\_6\_E.



## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pela saúde, pela alegria, pela minha família, pelos meus amigos, pelas oportunidades, por iluminar o meu caminho, pelas minhas conquistas.

Aos meus pais e irmãos por me apoiarem e acreditarem em mim.

Aos orientadores, Professora Doutora Lillian Barros (IPB), Professora Doutora Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira (IPB) e o Professor Doutor Ilton José Baraldi (UTFPR-MD) pela orientação, pela atenção e dedicação durante toda a elaboração do trabalho.

Agradeço a toda equipa do BioChemCore, em especial à Doutora Cristina Caleja, que me concedeu todo o apoio e acompanhamento com muita atenção e carinho.

A todos os professores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Medianeira, e também aos professores do Instituto Politécnico de Bragança, que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação.

Aos meus amigos que fizeram parte dessa etapa importante da minha vida.

Enfim, a todos, que me deram apoio para minha formação e elaboração deste trabalho.

# ÍNDICE

---

---

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>X</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. ADITIVOS ALIMENTARES E INGREDIENTES FUNCIONAIS.....</b>	<b>17</b>
2.1.1. APLICAÇÃO DE ADITIVOS CONSERVANTES NA INDÚSTRIA ALIMENTAR .....	21
2.1.2. APLICAÇÃO DE INGREDIENTES FUNCIONAIS NA INDÚSTRIA ALIMENTAR.....	23
2.1.3. COMPOSTOS FENÓLICOS COMO CONSERVANTES ALIMENTARES E INGREDIENTES FUNCIONAIS .....	27
<b>2.2. OBTENÇÃO DE INGREDIENTES RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS .....</b>	<b>30</b>
2.2.1. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO .....	31
2.2.2. BIODISPONIBILIDADE E ESTABILIDADE.....	33
2.2.3. APLICAÇÃO NOS PRODUTOS ALIMENTARES.....	34
<b>2.3. APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS NA INDÚSTRIA AGROALIMENTAR.....</b>	<b>36</b>
2.3.1. PROBLEMÁTICA DOS RESÍDUOS NA INDÚSTRIA AGROALIMENTAR .....	37
2.3.2. CASO PARTICULAR DOS BIORESÍDUOS DE CASCA DE KIWI .....	39
2.3.3. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE KIWI .....	41
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>

<b>3.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2. REAGENTES.....</b>	<b>48</b>
<b>3.3. DETERMINAÇÃO DO VALOR NUTRICIONAL DAS POLPAS DE ACTINIDIA DELICIOSA CV “HAYWARD” E ACTINIDIA SPP.....</b>	<b>49</b>
<b>3.4. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS POLPAS E CASCAS DE KIWI VERDE E KIWI VERMELHO... </b>	<b>50</b>
3.4.1. AÇÚCARES .....	50
3.4.2. ÁCIDOS ORGÂNICOS .....	51
3.4.3. ÁCIDOS GORDOS .....	51
3.4.4. TOCOFERÓIS.....	52
3.4.5. COMPOSTOS FENÓLICOS.....	53
<b>3.5. AVALIAÇÃO DAS PROPIEDADES BIOACTIVAS DAS POLPAS E CASCAS DE KIWI VERDE E KIWI VERMELHO.... </b>	<b>56</b>
3.5.1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	56
3.5.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	58
3.5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-TUMORAL .....	59
3.5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA .....	61
<b>3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>61</b>
<b><u>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</u></b>	<b><u>63</u></b>
<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u></b>	<b><u>82</u></b>

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Plantação de <i>Actinidia deliciosa</i> .....	12
<b>Figura 2.</b> Produção de Geléia de Kiwi .....	15
<b>Figura 3.</b> Relação da quantidade de antocianinas encontradas em diferentes partes do fruto de diferentes genótipos de <i>A. chinensis</i> (1 e 2), <i>A. deliciosa</i> (3), <i>A. eriantha</i> (4), <i>A. melanandra</i> (5), <i>A. arguta</i> var. <i>purpurea</i> (6), e <i>A. arguta</i> (7).....	44
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática dos objetivos do presente trabalho. ....	46
<b>Figura 5.</b> Amostras antes e após o processo de liofilização. ....	47

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1. Composição nutricional do kiwi, maçã e laranja por 100 g de fruto comestível (INSA, 2006). .....	14
Tabela 2. Exemplos de alguns aditivos alimentares utilizados pela indústria.....	20
Tabela 3. DDR de alguns conservantes autorizados pela União Europeia.....	22
Tabela 4. Exemplos de produtos alimentares funcionalizados e algumas propriedades benéficas apontadas para a saúde do consumidor. ....	26
Tabela 5. Principais classes de compostos. ....	28
Tabela 6. Exemplos de microencapsulação de compostos fenólicos. ....	34
Tabela 7. Alimentos funcionais elaborados com farinha de banana verde. ....	35
Tabela 8. CBO de diferentes tipos de efluentes.....	40
Tabela 9. Percentual de resíduos obtidos em diferentes processos. ....	41
Tabela 10. Quantificação dos compostos fenólicos em extratos de 8 genótipos de Actinidia. ....	43
Tabela 11. Composição nutricional (g/100 g fw), valor energético (kcal/100 g fw), composição em açúcares livres (g/100 g fw) e ácidos gordos (percentagem relativa) da polpa de kiwi verde (PuKG) e polpa de kiwi vermelho (PuKR).....	64
Tabela 12. Tocoferóis (mg/100 g fw) e ácidos orgânicos (g/100 g fw) da polpa e casca de kiwi verde (PeKG e PuKG, respetivamente) e da polpa e casca de kiwi vermelho (PuKR e PeKR, respetivamente). ....	69
Tabela 13. Composição em compostos fenólicos dos extratos de polpa e casca kiwi verde (PuKG e PeKG, respetivamente) e de extratos de polpa e casca de kiwi vermelho (PuKR e PeKR, respetivamente). ....	71
Tabela 14. Atividade antioxidante baseada em células de extratos de polpa de kiwi verde (PuKG) e casca (PeKG) e de extratos de polpa de kiwi vermelho (PuKR) e de casca (PeKR) avaliados por ensaios de OxHLIA e TBARS. ....	75

Tabela 15. Citotoxicidade, hepatotoxicidade e atividade anti-inflamatória do extrato da polpa de kiwi verde (PuKG) e da casca (PeKG) e do extrato da polpa de kiwi vermelho (PuKR) e da casca (PeKR). ..... 77

Tabela 16. Atividade antimicrobiana do extrato da polpa de kiwi verde (PuKG) e da casca (PeKG) e do extrato da polpa de kiwi vermelho (PuKR) e da casca (PeKR)..... 78

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>AAPH</b>	Dicloro-hidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ASAE</b>	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
<b>AOAC</b>	Metodologias oficiais de análise de alimentos
<b>BHA</b>	Butil-hidroxianisol
<b>BHT</b>	Butil-hidroxianisol
<b>CBO</b>	Carência Bioquímica de Oxigênio
<b>CH<sub>0</sub></b>	Densidade óptica da hemólise completa a 0 min
<b>CMB</b>	Concentrações mínima bactericida
<b>CFI</b>	Concentrações mínima inibitória
<b>CMF</b>	Concentrações mínimas fúngica
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional do Meio Ambiente
<b>DAD</b>	Detetor de díodos
<b>DDR</b>	Dose Diária Recomendável
<b>DMEM</b>	Meio Eagle modificado por Dulbecco
<b>EAC</b>	Extração assistida por calor
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentração de extrato que provoca 50% de inibição da produção de NO ou da peroxidação lipídica ou da hemólise oxidativa
<b>EFSA</b>	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
<b>ESI</b>	Fonte de ionização por espalhamento de elétrons
<b>FAME</b>	Esteres metílicos de ácidos gordos

<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
<b>FBV</b>	Farinha de Banana Verde
<b>FW</b>	Peso fresco
<b>g</b>	Gramas
<b>GC-FID</b>	Cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>HAE</b>	Extração assistida por calor
<b>HBSS</b>	Solução salina balanceada de Hank
<b>HeLa</b>	Linha celular tumoral humana do carcinoma da cervical
<b>HepG2</b>	Linha celular tumoral humana do carcinoma hepatocelular
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada
<b>ICA</b>	Intercâmbio comercial do agronegócio
<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estatística
<b>INS</b>	Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares
<b>INT</b>	Cloreto de iodonitrotetrazólio
<b>HPLC-FL</b>	HPLC acoplado a um detetor de fluorescência
<b>HT<sub>50</sub></b>	Tempo hemolítico de 50%
<b>INT</b>	Cloreto de iodonitrotetrazólio
<b>kHz</b>	Quilo-Hertz
<b>kg</b>	Quilograma
<b>L</b>	Litro
<b>LER</b>	Lista Europeia de Resíduos
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>MA</b>	Malte ágar
<b>MAE</b>	Extração assistida por micro-ondas
<b>MCF-7</b>	Linha celular tumoral humana do carcinoma da mama

<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MHB</b>	Caldo Mueller Hinton
<b>MIB</b>	Concentração mínima inibitória
<b>MIC</b>	Concentração mínima bactericida
<b>min</b>	Minutos
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MS</b>	Mass spectrometry – Espectrometria de massas
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NED</b>	Hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NCI-H460</b>	Linha celular tumoral humana do carcinoma do pulmão
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de amônio
<b>nm</b>	Nanometro
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OxHLIA</b>	Ensaio de inibição da hemólise oxidativa
<b>PeKG</b>	Casca de kiwi verde
<b>PeKR</b>	Casca de kiwi vermelho
<b>pH</b>	Potencial de hidrogénio iónico
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PLP2</b>	Culturas primárias de células de fígado de porco não tumorais
<b>PuKG</b>	Polpa de kiwi verde
<b>PuKR</b>	Polpa de kiwi vermelho
<b>RAW 264.7</b>	Linha de células macrófagas de rato
<b>RI</b>	Índice de Refração

<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SD</b>	Desvio padrão
<b>SENAI</b>	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
<b>SO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Enxofre
<b>S<sub>0</sub></b>	Densidade ótica da amostra no tempo 0
<b>SRB</b>	Sulforrodamina B
<b>S<sub>t</sub></b>	Densidade ótica da amostra no tempo t
<b>TBARS</b>	Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TRIS</b>	<i>Tris</i> (hidroximetil)aminometano
<b>TSB</b>	Caldo triptona de soja
<b>UAE</b>	Extração assistida por ultrassom
<b>UE</b>	União Europeia
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Δt</b>	Tempo de atraso da hemólise

## RESUMO

---

Os frutos são reconhecidos por apresentarem na sua composição níveis muito elevados de substâncias biologicamente ativas descritas pelos seus benefícios para a saúde. Os kiwis são um exemplo de frutos com excelentes propriedades que vêm justificando o aumento do seu consumo e a consequente produção de toneladas de resíduos que não são aproveitados adequadamente. Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar duas variedades de kiwi: *Actinidia deliciosa* cv. "Hayward" (kiwi verde) e *Actinidia* spp. (kiwi vermelho) em relação ao valor nutricional das suas polpas, mas também à composição química e bioatividades da polpa e da casca. A avaliação nutricional revelou que as polpas apresentam elevado teor em água e baixa quantidade de cinzas, proteínas e hidratos de carbono. Ambas as polpas apresentaram uma prevalência de ácidos gordos polinsaturados, sendo o ácido linoleico o maioritário. As cascas de ambas as variedades revelaram o maior teor de tocoferóis, apresentando três das isoformas ( $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ). Estes bioresíduos também apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos, especialmente a casca de kiwi verde. Por sua vez, apenas a polpa de kiwi vermelho apresentou uma antocianina (cianidina-3-*O*-sambubiosídeo), responsável pela sua cor interna. Em geral, as cascas exibiram uma maior atividade antioxidante e a casca de kiwi verde mostrou citotoxicidade contra todas as linhas celulares tumorais testadas e atividade anti-inflamatória, o que poderá estar relacionado com um conteúdo em compostos fenólicos mais elevado. Assim, estes componentes de kiwi atualmente subutilizados podem ser indicados como uma fonte de ingredientes naturais funcionalizantes com vários benefícios para a saúde humana.

**Palavras-chave:** *Actinidia deliciosa* cv. "Hayward"; *Actinidia* spp; subprodutos; caracterização nutricional e química; propriedades antioxidantes/antimicrobianas/anti-inflamatórias/citotóxicas.

---

## ABSTRACT

---

Fruits are recognized as having very significant levels of biologically active substances recognized for their health benefits. Kiwis are an example of fruits with excellent properties which has been justifying the increase of its consumption and the consequent generation of tons of waste that are not properly harnessed. Thus, the objective of this work was to compare two varieties of kiwi: *Actinidia deliciosa* cv. “Hayward” (green kiwi) and *Actinidia* spp. (red kiwi) regarding the nutritional value of their pulps, but also the chemical composition and bioactivities of each pulp and peel. The nutritional assessment revealed that pulps have a high water content and low amount of ash, protein and carbohydrates. Both pulps presented a prevalence of polyunsaturated fatty acids, with linoleic acid as the major one. The peels of both varieties revealed the highest total tocopherols content, presenting three of the tocopherol isoforms ( $\alpha$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ ). These byproducts also presented the highest concentration of phenolic compounds, especially the green kiwi peel. In turn, only the red kiwi pulp presented an anthocyanin (cyanidin-3-*O*-sambubioside), which is responsible for its interior colour. In general, the peels exhibited the highest antioxidant activity and the green kiwi peel showed cytotoxicity against all tested tumoral cell lines, and anti-inflammatory activity, which could be related to its higher content in phenolic compounds. Thus, these kiwi components currently underutilized may be indicated as a source of natural functionalizing ingredients with several benefits for human health.

**Keywords:** *Actinidia deliciosa* cv. “Hayward”; *Actinidia* spp; byproducts; nutritional and chemical characterization; antioxidant/antimicrobial/anti-inflammatory/cytotoxic properties.

## 1. INTRODUÇÃO

*Actinidia deliciosa* (**Figura 1**), popularmente designado por quiuí ou kiwi, é um fruto comestível nativo do Norte da China, que atualmente é produzido e comercializado mundialmente. Na União Europeia, a produção de kiwi tem vindo a crescer exponencialmente nas últimas décadas, sendo que a área cultivada já representa números muito significativos. A nível mundial, a produção de kiwi em 2017, atingiu valores de 4.038.872 toneladas, sendo o mercado dominado por países como China, Itália, Nova Zelândia e Chile (FAO, 2019).



**Figura 1** - Plantação de *Actinidia deliciosa* (Frutíferas.com.br)

As variedades consideradas de maior importância a nível mundial são *Hayward*, *Qinmei* e *Xuxiang*, todas elas de cor verde característica da espécie *Actinidia deliciosa*, e também a variedade *Hongyang* de cor verde e vermelho no centro da polpa, característica da espécie *Actinidia chinensis*. De todas essas cultivares, a *Hayward* destaca-se como a mais importante a nível comercial representando 33% da produção total mundial (Ferguson, 2015).

No caso particular de Portugal, a *Hayward* é a cultivar predominante, sendo que estes frutos representam cerca de 55% dos frutos subtropicais produzidos, registando em 2017, uma produção de 35,4 mil toneladas (INE, 2018). No Brasil, a introdução do cultivo de kiwi ocorreu por volta da década de 70, e desde então tem-se verificado um interesse crescente, devido aos bons preços atingidos pelo fruto no mercado nacional e ao alto rendimento de produção (Carvalho & Lima, 2002; Latocha, 2017). A maior produção de kiwis tem sido registada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, sendo as principais cultivares *Actinidia deliciosa* (polpa verde) e *Actinidia chinensis* (polpa amarela) (Silveira et al, 2012). Ainda assim, a produção nacional de kiwi no Brasil não consegue responder à procura interna, e como tal a grande parte do consumo de kiwi está relacionado com a importação, principalmente do Chile e de países da União Europeia, atingindo uma importação de 23.473,00 toneladas no ano de 2011 (ICA, 2012).

O tipo de variedade bem como a zona de cultivo tem influência no ciclo de produção destes frutos, alterando desta forma a época de colheita. Por exemplo, no Hemisfério Sul, os quivizeiros (*Actinidia spp.*) apresentam um repouso vegetativo após a perda das folhas no inverno, ocorrendo o abrolhamento em setembro e a colheita de frutos até meados do mês de maio (AJAP, 2017). Por sua vez, no Hemisfério Norte, o kiwi cv. '*Hayward*' possui um ciclo reprodutivo que ocorre entre o final de maio e o começo de junho, apresentando crescimento máximo dos frutos em julho (Neves, 2008).

O kiwi é um fruto caracterizado pelo seu sabor doce e ligeiramente ácido, sendo reconhecido mundialmente como um alimento funcional, que para além de satisfazer as necessidades nutricionais básicas, apresenta efeitos fisiológicos benéficos para a saúde dos consumidores (Iwasana et al, 2011). A nível nutricional o kiwi é descrito como sendo rico em fibras dietéticas, compostos bioativos como vitaminas (C, E e A), compostos fenólicos e minerais (Franco & Antunes, 2008). A **Tabela 1** compara a composição do kiwi com outros frutos (maçã e laranja) mundialmente consumidos, onde é possível constatar que o kiwi é rico em vitaminas e minerais, destacando valores de vitamina C superiores aos apresentados pela laranja.

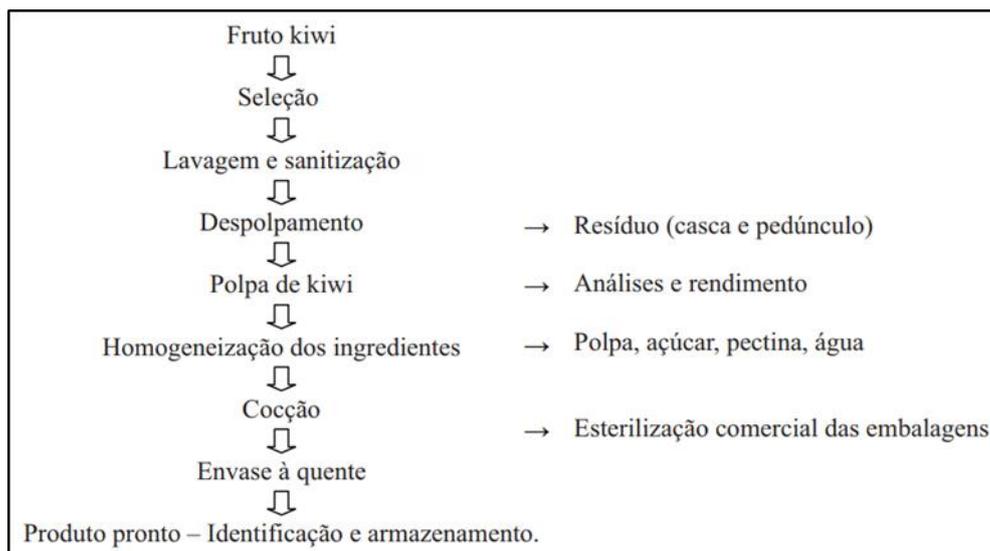
**Tabela 1.** Composição nutricional do kiwi, maçã e laranja por 100 g de fruto comestível (INSA, 2006).

Macronutrientes	Unidades	Kiwi	Maçã	Laranja
Água	g	82,9	82,9	86,3
Proteínas	g	1,1	0,2	1,1
Lípidos Totais	g	0,5	0,5	0,2
Hidratos de Carbono	g	10,9	13,4	8,9
Fibra Alimentar	g	1,9	2,1	1,8
Valor energético	kcal	53	57	42
<b>Vitaminas</b>				
A	µg	7,0	4,0	20
Caroteno	µg	42	26	120
D	mg	0	0	0
α-Tocoferol	mg	0,40	0,59	0,24
Tiamina	mg	0,020	0,020	0,090
Riboflavina	mg	0,050	0,030	0,050
Niacina	mg	0,30	0,10	0,70
Triptofano/60	mg	0,20	0,10	0,10
B6	mg	0,020	0,040	0,10
B12	µg	0	0	0
C	mg	72	7,0	57
Folatos	µg	42	5,0	31
<b>Minerais</b>				
Cinza	g	0,72	0,32	0,42
Sódio (Na)	mg	9,0	6,0	4,0
Potássio (K)	mg	302	139	159
Cálcio (Ca)	mg	19	6,0	35
Fósforo (P)	mg	28	8,0	19
Magnésio (Mg)	mg	18	8,0	11
Ferro (Fe)	mg	0,4	0,2	0,2
Zinco (Zn)	mg	0,2	0	0,1
<b>Ácidos Gordos</b>				
Saturados	g	0,1	0,1	0
Monoinsaturados	g	0,1	0	0
Polinsaturados	g	0,2	0,2	0,1
Trans	g	0	0	0
Ácido linoleico	g	0,1	0,1	0
Colesterol	mg	0,1	0	0

Os frutos de *Actinidia* têm vindo a despertar um grande interesse, principalmente devido aos benefícios reportados a nível da saúde do consumidor, estando estes cada vez mais descritos e divulgados. O kiwi é normalmente consumido *in natura*, mas a indústria alimentar tem vindo a apostar na sua comercialização sob diversas formas processadas, como sumo ou polpa congeladas, doces, sorvetes, entre outros produtos (Tavarini et al., 2008).

Os frutos com maturação avançada são os mais indicados para processamento, durante o qual o fruto passa pela operação de despulpamento, seguindo posteriormente

para a preparação de determinados produtos, com por exemplo geleia de kiwi (**Figura 2**) (Iensen et al., 2013). Deste processamento resulta um subproduto, a casca de kiwi, o qual representa cerca de 30% de todo o fruto. Este subproduto apresenta um grande potencial de aproveitamento, devido aos seus constituintes ricos em nutrientes e compostos fenólicos com atividade antioxidante, podendo ser utilizado em formulações para o desenvolvimento de novos produtos (Lousada Junior et al., 2006).



**Figura 2.** Produção de Geleia de kiwi (Iensen et al., 2013).

Segundo Bernardes et al., (2011), foram encontrados valores mais elevados para a quantidade de fenóis totais na casca de kiwi (1273,41 mg/100g), quando comparados com a casca de laranja (472,78 mg/100g) ou casca de maçã (328,55 mg/100g). Adicionalmente alguns estudos têm revelado, que por vezes, as cascas dos frutos apresentam maior quantidade de compostos fenólicos totais do que as polpas (Fiorentino et al., 2009). Estes fatos são muito interessantes, pois normalmente apenas a polpa é consumida, sendo a casca descartada, e, portanto, desaproveitado o grande potencial deste subproduto.

Desta forma, talos, folhas e cascas podem ser considerados muitas vezes, mais nutritivos do que a parte dos alimentos habitualmente ingeridos. O aproveitamento integral dos alimentos é uma das formas de minimizar o desperdício e o impacto ambiental, pois quando os alimentos são descartados de forma inadequada, estes promovem maus odores e produção de resíduo orgânico (líquido que resulta da decomposição do lixo), podendo contaminar rios e lençóis freáticos. Desta forma, o aproveitamento de bio-resíduos é visto

como uma prática ecologicamente correta para além de proporcionar novos produtos capazes de acarretar benefícios para a saúde do consumidor (Lelis, 2015).

A casca de kiwi é um subproduto que tem vindo a ser utilizado na elaboração de farinhas, apresentando elevado teor de fitoquímicos e atividade antioxidante (Soquetta, 2015). Da casca de kiwi também poderá ser obtido biogás de melhor qualidade, através da digestão anaeróbia utilizando casca de kiwi como substrato (Gonçalves, 2016). A presença de ácido protocatecuico, ácido clorogénico, ácido cafeico, rutina, ácido *p*-hidroxibenzoico e a quercetina, neste subproduto desperta um grande interesse a nível industrial. No entanto, considera-se necessária a realização de mais estudos complementares que permitam garantir o aproveitamento da sua total bioatividade (Wang et al., 2018).

Tendo em conta a elevada quantidade de casca de kiwi obtida durante o processamento na elaboração de produtos derivados do kiwi e, conseqüentemente, o impacto direto a nível ambiental que poderá ser causado aquando da sua eliminação, o presente trabalho pretende avaliar o potencial deste subproduto, estudando duas variedades de kiwi (*Actinidia deliciosa* cv “Hayward” – polpa verde e *Actinidia* spp. – polpa vermelha). Desta forma, para além de caracterizar nutricionalmente a polpa de ambas as variedades de kiwi, realizou-se a caracterização química e a avaliação das bioatividades (antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-tumoral) das diferentes polpas e cascas. Este estudo visa conhecer e valorizar o subproduto destas duas variedades, analisando o seu potencial como um ingrediente natural para aproveitamento a nível industrial.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. ADITIVOS ALIMENTARES E INGREDIENTES FUNCIONAIS**

Devido ao aumento populacional, houve por parte da indústria alimentar a necessidade de aumentar a introdução de diversos aditivos nos produtos alimentares, de forma a garantir que, mesmos percorrendo largas distâncias esses produtos chegam aos consumidores nas melhores condições (Carocho, Barreiro, Morales, & Ferreira, 2014).

O órgão internacional de referência responsável por proteger, promover e garantir o uso e consumo de aditivos é o Codex Alimentarius que em conjunto com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial de Saúde (OMS), desenvolvem centenas de normas, diretrizes e códigos, no sentido de promover práticas aceitáveis no comércio de alimentos. Cada país possui a sua própria legislação sobre aditivos alimentares; no Brasil, o órgão público responsável por controlar e fiscalizar os aditivos alimentares é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); em Portugal considera-se o Regulamento (UE) N.º 1129/2011 (2011).

De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), os aditivos alimentares definem-se como, “substâncias adicionadas intencionalmente aos alimentos para realizar determinadas funções tecnológicas, como por exemplo, dar cor, adoçar ou ajudar na conservação de alimentos”. Na União Europeia, todos os aditivos alimentares são identificados por um código E seguido de 3 algarismos sendo que, o primeiro algarismo dá uma informação que permite identificar a função do aditivo no alimento processado (por exemplo se é corante ou conservante).

No entanto, de acordo com a Anvisa (1997), um aditivo alimentar define-se como, “qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem o propósito de nutrir, tendo como objetivo melhorar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais do produto, desde a sua fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação, aumentando assim o tempo de prateleira de um determinado alimento ou bebida”. Tal definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas no alimento para manter ou melhorar as suas propriedades nutricionais. No que concerne à identificação dos aditivos, o Brasil segue as mesmas regras da Europa em termos de numeração, no entanto utiliza o código INS antes da série de algarismos.

Os aditivos alimentares podem ser classificados como: conservantes, acidificantes, emulsionantes, estabilizantes, espessantes, humidificantes, anti-humidificantes, corantes, aromatizantes e edulcorantes. Cada aditivo alimentar deve apresentar explicitamente as suas propriedades funcionais e os seus limites de utilização (Carocho & Ferreira, 2017).

A evolução na tecnologia de alimentos está diretamente relacionada com a mudança no hábito alimentar dos consumidores. A necessidade de recorrer a técnicas de conservação vem já de tempos ancestrais como por exemplo, a utilização da defumação para produzir produtos defumados (carnes e derivados), o uso de sal para salgar carnes e peixes, conservando e melhorando as características sensoriais do produto e o recurso à fermentação de alimentos de origem vegetal e animal. Os antigos egípcios já utilizavam corantes e aromatizantes e os romanos nitratos e especiarias, tanto para conservar como para melhorar a aparência dos alimentos. Com o avanço das tecnologias, novas substâncias foram descobertas, proporcionando à indústria alimentar uma solução não só para a conservação dos alimentos, mas também para conferir aos produtos aroma, aparência, sabor e a textura desejada (Gava, Silva & Farias, 2008).

Segundo Gava et al. (2008), o uso de aditivos é permitido para: aumentar o valor nutricional de um alimento; reduzir as perdas de alimentos, aumentando a sua conservação ou a sua estabilidade; e/ou tornar os alimentos mais atrativos aos olhos dos consumidores, sem induzi-los a erro. Além disso, estabeleceu-se que o seu uso seria proibido para as seguintes situações: quando interferir significativamente com o valor nutricional do produto; apresentar toxicidade; e/ou quando não autorizado pela legislação de aditivos alimentares.

A procura de novos aditivos, tem obrigado a indústria alimentar a investir em novos estudos e desenvolvimento de novas metodologias. Além disso, uma vez que a questão do uso de aditivos é ainda um assunto preocupante aos olhos dos consumidores, há a necessidade de procurar aprovações e certificações em órgãos regulatórios (Savioli, 2017).

Alguns estudos associam o consumo de determinados aditivos artificiais quando ingeridos em quantidades maiores que as recomendadas ou não declaradas com alguns problemas de saúde nomeadamente, alergia alimentar (Savioli, 2017). Daí se considerar de extrema importância a existência de um órgão regulatório. Tais preocupações têm levado a vários desenvolvimentos na indústria alimentar que tem procurado alternativas aos aditivos artificiais.

Atualmente os alimentos funcionais representam uma das áreas de investigação que mais tem despertado interesse (Annunziata & Vecchio 2011).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de provar a aplicação de extratos naturais em produtos alimentares, visando comparar o seu desempenho relativamente aos aditivos artificiais normalmente utilizados na indústria alimentar. Os extratos aquosos de *Foeniculum vulgare* Mill. (funcho) e *Matricaria recutita* L. (camomila) demonstraram o seu potencial como ingredientes naturais em iogurtes (Caleja, Barros, Antonio, Caroch, Oliveira & Ferreira, 2016) e biscoitos (Caleja, Barros, Antonio, Oliveira & Ferreira, 2017a).

O rizoma de *Curcuma longa* Linn, mais conhecido como Açafrão da Índia ou Cúrcuma é utilizado na culinária como especiaria, aromatizante e agente corante. Desde tempos ancestrais que, este rizoma é utilizado na medicina tradicional no tratamento de algumas sintomatologias como tosse, distúrbios hepáticos e problemas cardiovasculares. Vários estudos descrevem a curcumina, o principal componente encontrado no rizoma da Cúrcuma, como detentor de excelentes propriedades bioativas tais como, atividades anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena, hepatoprotetora, neuroprotetora, cardioprotetora, hipoglicêmica, antirreumática e antidiabética (Meng et al, 2018). Estas propriedades têm vindo a despertar grande interesse de aplicação alimentar. De acordo com Arulkumar et al. (2017), a aplicação de extrato de cúrcuma no músculo de choco (*Sepia brevimana*) apresenta efeitos significativos quanto ao aumento do tempo de prateleira deste produto com armazenamento refrigerado, para além de se verificar que a sua incorporação revelou potencial de inibição de algumas bactérias formadoras de amina biogénica.

Na

**Tabela 2**, são apresentados exemplos de alguns aditivos alimentares naturais e artificiais normalmente utilizados pela indústria alimentar.

**Tabela 2.** Exemplos de alguns aditivos alimentares utilizados pela indústria.

ADITIVO ALIMENTAR	CLASSIFICAÇÃO
<b>Aromatizante</b>	<p><b>Naturais:</b> óleos essenciais, extratos, bálsamos, oleoresinas ou oleogomaresinas.</p> <p><b>Artificiais:</b> aromatizantes idênticos ao natural, aromatizantes artificiais, misturas de aromatizantes, aromatizantes de reação/transformação.</p>
<b>Corante</b>	<p><b>Naturais:</b></p> <p>Caramelo I – simples E150, Cúrcuma, curcumina E100 Carmim, ácido carmínico, cochonilha E120</p> <p><b>Artificiais:</b></p> <p>Tartrazina E102 Eritrosina E127</p>
<b>Conservante</b>	<p><b>Artificial:</b></p> <p>Ácido benzoico E210 Benzoato de sódio E211 Benzoato de potássio E212 Benzoato de cálcio E213 Sorbato de sódio E202</p>
<b>Humidificante</b>	<p><b>Artificial:</b></p> <p>Propileno glicol E1520</p>
<b>Estabilizante</b>	<p><b>Naturais:</b></p> <p>Agar-agar E406</p>
<b>Antioxidante</b>	<p><b>Naturais:</b></p> <p>Tocoferol E307</p> <p><b>Artificiais:</b></p> <p>Butil-hidroxianisol, BHA E320 Butil-hidroxitolueno, BHT E321</p>
<b>Espessante</b>	<p><b>Naturais:</b></p> <p>Carboximetilcelulose sódica E466 Carragena E407 Goma guar E412</p>
<b>Acidulante</b>	<p><b>Artificial:</b></p> <p>Ácido cítrico E330 Ácido tartárico E334</p>

ADITIVO ALIMENTAR	CLASSIFICAÇÃO
	Ácido fosfórico E338
<b>Edulcorante</b>	<b>Artificial:</b> Sacarina e seus sais de sódio, potássio e cálcio E954; Acessulfame de potássio E950

Fonte: adaptado de Silva, 2016.

### ***2.1.1. Aplicação de aditivos conservantes na indústria alimentar***

Na indústria alimentar, os conservantes são de especial importância para prevenir a deterioração dos alimentos, pela ação dos microrganismos ou pela oxidação. O aditivo conservante permite retardar ou inibir a ação de alguns microrganismos que podem produzir toxinas, comprometendo a saúde do consumidor bem como, evitar a rancificação das gorduras provocada pelo ar atmosférico, que pode provocar um sabor desagradável no alimento (Carocho et al., 2014).

Se em tempos ancestrais se recorria a algumas técnicas mais rudimentares para a conservação de alimentares, nomeadamente ao uso de sal e açúcar, a partir do século XX, os conservantes alimentares começaram a ser sintetizados, possibilitando o uso de novas substâncias nos alimentos e impedindo alterações indesejadas na cor e no sabor dos produtos alimentares (Shibamoto & Bjeldanes, 2014).

Apesar de utilizados rotineiramente pela indústria algumas pesquisas revelam alguns efeitos adversos a nível de saúde do consumidor correlacionados com o consumo excessivo de aditivos químicos presentes nos alimentos. Segundo a ASAE (2017), alguns desses aditivos (maioritariamente sulfitos, determinados corantes e benzoatos), podem provocar em indivíduos mais sensíveis, reações de intolerância como asma ou alergias. Para evitar situações adversas a saúde dos consumidores tem vindo a ser estabelecidas doses diárias recomendadas para cada aditivo de forma a garantir segurança ao consumidor.

A Dose Diária Recomendável (DDR) é um termo utilizado para definir a quantidade de ingestão máxima de um composto químico presente num alimento e/ou na água que quando é ingerida possa garantir a ausência de toxicidade, durante toda a vida e de forma vitalícia. O nível de ingestão considerado aceitável é expresso em miligramas do

químico por quilograma de massa corporal (mg/kg) (Lu & Kacew, 2002). Este termo é de extrema importância de forma a garantir a segurança para os consumidores. A Tabela 3 apresenta uma lista com alguns conservantes autorizados pela UE e as respectivas DDR em determinadas classes de alimentos mais usuais.

**Tabela 3.** DDR de alguns conservantes autorizados pela União Europeia.

<b>Código E</b>	<b>Nome</b>	<b>Classe de alimento</b>	<b>DDR (mg/kg)</b>
200	Ácido sórbico	Queijo e produtos à base de queijo	1000
210	Ácido benzoico	Frutos e produtos hortícolas em vinagre, óleo ou salmoura	2000
220	Dióxido de enxofre	Frutos e produtos hortícolas em vinagre, óleo ou salmoura	100
234	Nisina	Natas e natas em pó	10
249	Nitrito de potássio	Produtos à base de carne	100
251	Nitrato de sódio	Produtos à base de carne	150

A nível industrial é usual a aplicação de nitratos ou nitritos em produtos cárneos de forma a evitar o desenvolvimento de células vegetativas e esporos do microrganismo *Clostridium botulinum*, para além de garantir uma cor e sabor característico e evitar a rancificação do produto. No entanto, é necessário estabelecer um controlo rigoroso na quantidade adicionada ao produto, uma vez que se encontra descrito que acima do limite de tolerância estabelecido, o seu consumo poderá ser tóxico, de forma direta com formação de meta-hemoglobina e de forma indireta com a formação de nitrosamina (SENAI, 2016).

Na produção de vinhos, a adição do dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) é considerada de extrema importância uma vez que garante diversas propriedades nomeadamente, ação antisséptica, antioxidante, antidiatéctica, dissolvente, entre outras que permitem que o vinho tenha um tempo de prateleira maior (Amarante, 2018).

Por sua vez o benzoato de sódio (E211) é um conservante alimentar amplamente utilizado em recheio de biscoitos, doces, refrigerantes, pickles, molho para saladas, compotas e cervejas. Apesar de ser amplamente aplicado na indústria alimentar, por ser reconhecido como fungicida e bactericida no alimento, quando o seu consumo é superior ao estabelecido como recomendável, estão descritos alguns problemas a nível da saúde do consumidor (Dixit et al. 2008).

Nesse sentido, alguns estudos têm vindo a ser realizados testando o potencial conservante de algumas matrizes naturais em diferentes produtos alimentares. Carochó et al. (2016) testou a aplicação de flores de castanheiro e cidreira em queijos da “Serra da Estrela” apresentando excelentes resultados. Alguns autores estudaram a aplicação de medronho com agente funcionalizante e conservante em pão de forma (Takwa et al., 2018), obtendo-se resultados muito promissores.

### ***2.1.2. Aplicação de ingredientes funcionais na indústria alimentar***

A indústria alimentar responsável por produzir alimentos funcionais tem apresentado um crescimento exponencial, aliado ao interesse e procura por parte dos consumidores por novos produtos com alegações de benefícios para a saúde (Bigliardi & Galati, 2013).

Ainda que não exista uma definição universalmente aceite para os alimentos funcionais assume-se, que um alimento adquire estatuto de alimento funcional quando para além da sua função básica nutritiva, garante apresentar efeitos fisiológicos benéficos para a saúde, quer seja especificamente na redução do risco de desenvolvimento de doença ou na melhoria de uma situação de saúde. Este tipo de alimentos desperta um interesse crescente uma vez que para além de apresentar um papel muito importante como promotor de saúde representa um importante impacto a nível económica uma vez que terá uma influência direta na redução de custos na saúde bem como na melhoria da qualidade de vida (Carochó et al., 2014).

Dependendo da sua natureza, os alimentos funcionais podem ser classificados como, alimentos funcionais naturais (ou não modificados) e modificados. No entanto, ainda que possam ser modificados, estes alimentos têm de garantir sempre a segurança para o consumidor não alegando benefício para a saúde em compensação do risco.

Os alimentos funcionais são misturas complexas que podem intercalar o composto ativo, modular a sua libertação ou inibir a sua atividade. Desta forma, a matriz alimentar, tanto no seu estado bruto, como após a preparação culinária ou armazenamento, pode ter uma influência significativa sobre a atividade ou libertação dos principais componentes. Assim, um passo crucial para o sucesso dos alimentos funcionais é o desenvolvimento de veículos alimentares adequados para manter a forma ativa até ao momento do consumo, e entrega no local alvo desejado no organismo (Betoret et al., 2011).

São várias as matrizes naturais que têm vindo a ser estudadas e apontadas como excelentes fontes de compostos bioativos. Os principais compostos bioativos e ingredientes funcionais adicionados aos alimentos, são os probióticos, prebióticos, fibras alimentares, fitoesteróis, carotenoides, compostos fenólicos e ácidos gordos (Salgado, 2017).

Os probióticos são encontrados em alimentos fermentados como iogurte, chucrute, kimchi, alimentos que contêm microrganismos vivos (por exemplo, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) responsáveis pela colonização da microflora intestinal. Estes conseguem exercer efeitos benéficos em doenças e condições como diarreia e recolonização após antibioticoterapia. Os alimentos prebióticos têm sido considerados como estimuladores seletivos do crescimento de algumas bactérias como as bifidobactérias intestinais e são representados pelo alho, cebola, folhas de dente-de-leão, alcachofra de Jerusalém e *jicama* (Bredesen, 2017).

Vários estudos têm vindo a ser desenvolvidos no intuito de testar diferentes matrizes vegetais que devido às excelentes propriedades bioativas que apresentam tem vindo a ser estudadas como potenciais ingredientes bioativos de forma a poderem ser aplicadas na indústria alimentar. Na **Tabela 4**, são listados alguns produtos, os respetivos ingredientes funcionais utilizados para enriquecer o produto bem como, as propriedades benéficas que o seu consumo provoca a nível da saúde do consumidor.

Conhecido popularmente como alecrim, *Rosmarinus officinalis* L. apresenta maioritariamente o ácido rosmarínico na sua composição. Devido às propriedades bioativas demonstradas por este composto, alguns autores têm estudado a sua aplicação como um ingrediente natural em formulações de alimentos funcionais (Ribeiro, Caleja, Barros, Buelga-Santos, Barreiro & Ferreira, 2017). Da mesma forma, também *Melissa officinalis* L. consumida desde tempos ancestrais por lhe serem atribuídas propriedades terapêuticas populares, foi estudada e comprovada essas mesmas propriedades bioativas sendo, posteriormente, incorporada em diferentes produtos alimentares (Carocho et al. 2016; Caleja et al., 2017b).

De acordo com Mona et al., (2009), as raízes em pó de chicória são ingredientes alternativos à farinha de trigo e gordura na produção de biscoitos tipo cracker. Os benefícios nutritivos da Chicória (*Cichorium intybus*) como fonte de fibras alimentares, presença de inulina na sua composição e de fruto-oligossacarídeos, desperta um potencial

interesse na indústria alimentar quanto à utilização desta planta, como um ingrediente funcional alimentar.

Os produtos lácteos, de pastelaria, panificação e alimentos para bebés surgem como os mercados de alimentos funcionais com maior evolução e investimento (Bigliardi & Galati, 2013; Menrad, 2003). Atualmente, são comercializados alguns produtos alimentares com funções benéficas para a saúde. Alguns exemplos de sucesso são: o iogurte líquido probiótico Actimel® da marca Danone® contendo culturas *Lactobacillus casei* Imunitass® ou o iogurte sólido Activia® da mesma marca, contendo Bifidus ActiRegularis®.

**Tabela 4.** Exemplos de produtos alimentares funcionalizados e algumas propriedades benéficas apontadas para a saúde do consumidor.

<b>Produto</b>	<b>Fonte de alimento</b>	<b>Ingrediente Funcional</b>	<b>Propriedades para a saúde</b>	<b>Referência</b>
Barra de cereal	Castanha-do-Brasil e Linhaça	Ácidos gordos ômega 3	Redução do colesterol e doenças cardiovasculares.	Covino et al., 2015
<i>Cookies</i>	Aveia e bagaço de uva	Fibras alimentares e antioxidantes	Ótima fonte de fibras e antioxidantes naturais	Piovesana & Bueno, 2013.
Pão integral	Amaranto	Fibra Alimentar	Melhora o funcionamento intestinal e consequentemente a redução da ocorrência do câncer de cólon. As fibras solúveis auxiliam no controle da glicemia e do perfil lipídico.	Montero-Quintero et al., 2014
Bebidas lácteas com sabor a mamão	Farinha da casca de jabuticaba	Flavonoides (antocianina) e Probiótico	Ação antioxidante, fontes de probióticos e cálcio.	Souza, 2016.
<i>Snacks</i>	Farinha de soja	Proteína de soja e fibra alimentar	Quantidades de proteínas e teores de fibras superiores.	Leonel et al., 2010.
Hambúrguer de soja	Linhaça e quinoa	Substâncias lignanas e ácidos gordos ômega 3	Acréscimo nos teores de proteínas, minerais, ácidos graxos polinsaturados, fibra alimentar e atividade antioxidante.	Dias et al., 2009.

### ***2.1.3. Compostos fenólicos como conservantes alimentares e ingredientes funcionais***

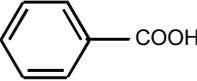
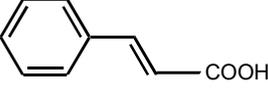
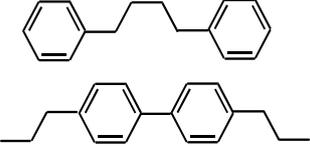
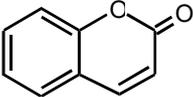
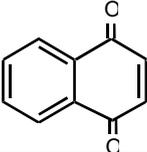
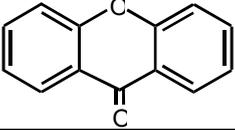
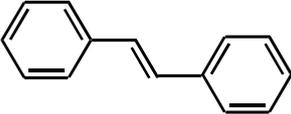
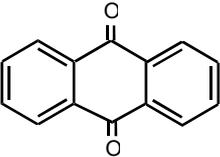
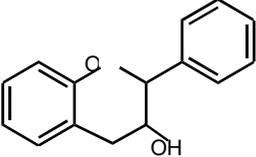
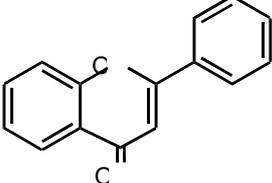
Os compostos fenólicos são considerados metabolitos secundários gerados por um mecanismo de defesa contra condições adversas ou de *stress*. Estes compostos estão presentes principalmente em extratos vegetais e são considerados de elevada relevância devido às suas excelentes propriedades bioativas (Souza, 2015). Apresentam diversos efeitos biológicos nomeadamente, efeitos bloqueadores de radicais livres, inibição da proliferação celular, antimicrobianos, antialérgicos e anti-inflamatórios. Alguns autores apontam estes compostos como relevantes na redução do risco do cancro e doenças cardiovasculares (Cunha, Moura, Barbosa & Santos, 2016).

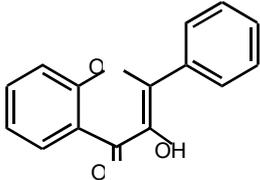
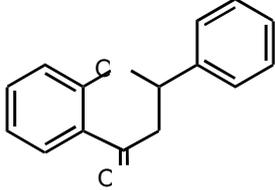
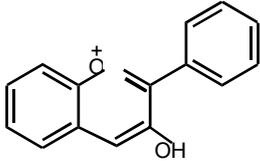
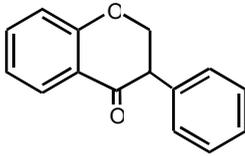
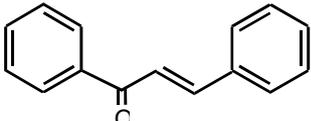
Os frutos e bebidas derivadas de plantas, como sumos de fruta, chás, café e vinho tinto tem sido apontados como as principais fontes alimentares de compostos fenólicos. Adicionalmente, os legumes, cereais, chocolate e leguminosas secas têm sido caracterizados por apresentar na sua composição uma quantidade muito significativa destes compostos (Scalbert, Johnson & Saltmarsh, 2005; Pandey & Rizvi, 2009).

Segundo a literatura, os compostos fenólicos são classificados de acordo com a sua estrutura química (**Tabela 5**), nomeadamente em fenóis simples (catecol, resorcinol, vanilina) com uma estrutura de carbono C6, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas (C6-C2-C6 - emodina), chalconas, taninos condensados e flavonoides que são divididos em subclasses com pequenas diferenças estruturais. Dentro dos flavonoides existem 6 subgrupos: os flavan-3-ol (ou flavanóis) definidos como uma das subclasses mais complexas; os flavonóis são um dos mais difundidos em todo o reino; as flavonas também são uma subclasse importante, que deriva da subclasse flavanonóis; as flavanonas são uma subclasse menor e, ocorrem principalmente em frutos; as isoflavonas, também conhecidas como fitoestrogénios, devido aos seus seus efeitos fitoestrogénicos; e, finalmente, as antocianinas, que tendem a acumular-se em flores e frutos (Santos-Buelga et al., 2012).

Alguns autores têm descrito diferentes bioatividades associadas a este tipo de compostos nomeadamente, efeitos antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório, antitumoral e hepatoprotetor. Estes compostos estão descritos na literatura como sendo ativos na neutralização de espécies reativas e na prevenção do *stress* oxidativo, atuando desta forma em diversas doenças (Carocho & Ferreira, 2013).

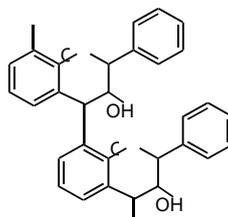
**Tabela 5.** Principais classes de compostos.

Classe	Estrutura química	Exemplos
Ácidos hidroxibenzoicos (C6-C1)		Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido gálico, ácido gentísico,
Ácidos hidroxicinâmicos (C6-C3) e derivados		Ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido clorogénico
Lignanais (C6-C2) <sub>2</sub>		Secoisolariciresinol, matairesinol, sesamina, enterodiol, enterolactona
Cumarinas (C6-C3)		Escopoletina, umbeliferona, aesculetina
Naftoquinonas (C6-C4)		Juglona, pumbalgina
Xantonas (C6-C1-C6)		Mangostina, mangiferina
Estilbenos (C6-C2-C6)		Resveratrol
Antraquinonas (C6-C2-C6)		Emodina
<b>Flavonoides (C6-C3-C6)</b>		
Flavan-3-óis		(Epi)catequina, (epi)galocatequina
Flavonas		Apigenina, luteolina, crisina

Flavonóis		Quercetina, canferol, miricetina
Flavanonas		Hesperidina, naringenina, eriodictiol
Antocianinas		Cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, petunidina, peonidina
Isoflavonas		Genisteína, daidzeína, gliciteína, formononetina, biocanina A, puerarina
Chalconas		Ploretina, arbutina, buteína, calcona

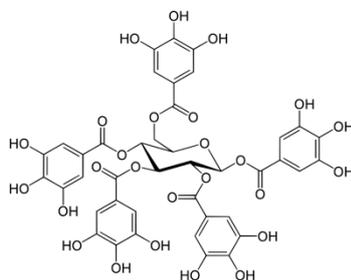
### Polifenóis Poliméricos

Taninos condensados  
(proantocianidinas) (C6-C3- $C_6$ )<sub>n</sub>



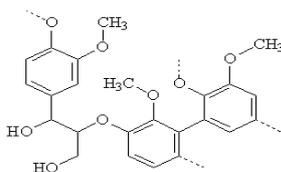
Procianidinas, prodelfidininas

Taninos hidrolisados  
(galotaninos, elagitaninos)



Pentagaloilglucose, vescalagina, castalagina

Ligninas (C6-C3)<sub>n</sub>



Fonte: adaptado de Santos-Buelga et al., 2012

As flores de camomila (*Matricaria recutia* L.) utilizadas comumente na preparação de infusões e decocções, apresentam na sua composição vários compostos fenólicos, nomeadamente, flavonoides e ácidos fenólicos (Caleja et al., 2015a). Esta composição tem sido apontada como justificação para as propriedades benéficas para a saúde humana associadas ao consumo desta planta. As flores de camomila apresentam um grande potencial de aplicação em alimentos lácteos e de pastelaria como conservantes naturais e/ou ingredientes funcionais (Caleja et al., 2015a; Caleja et al., 2016; Caleja et al., 2017a).

Do mesmo modo, também os frutos de *Arbutus unedo* L. e as folhas de *Ocimum basilicum* L., depois de caracterizados quimicamente como fontes de compostos fenólicos, apresentaram excelentes resultados que atestam o seu potencial conservante em pão de forma (Takwa et al., 2018).

Segundo Nowak et al., (2016), extratos polifenólicos de folhas de cerejeira (*Prunus cerasus* L.) e folhas de groselha preta (*Ribes nigrum* L.) apresentam elevada atividade antioxidante associada principalmente à presença de flavonoides e ácidos fenólicos, incluindo epigallocatequina e glicosídeos de quercetina e kaempferol. O potencial destes extratos como conservante natural foi testado em produtos cárneos onde se comprovou a sua capacidade no aumento do tempo de prateleira.

Por sua vez, o cravo-da-índia (*S. Aromaticum*) conhecido como aromatizante e conservante natural de alimentos, demonstrou capacidade de destruir patógenos transmitidos por alimentos, como *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* e *Listeria innocua* (Sofia et al., 2007). A literatura descreve o ácido gálico, ácido protocatecuico, quercetina, ácido clorogênico, ácido caféico e ácido ferúlico como os compostos maioritários presentes na composição do cravo-da-índia (Scherever, 2009).

## **2.2. OBTENÇÃO DE INGREDIENTES RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS**

Geralmente a extração dos compostos fenólicos é realizada recorrendo ao uso de diversos solventes como água, etanol, metanol, soluções de ácidos orgânicos, ou misturas de dois ou mais solventes. São aplicadas metodologias amplamente utilizadas e validadas, no entanto, alguns desses solventes apresentam desvantagens como toxicidade,

volatilidade e inflamabilidade, reduzindo o desempenho e a possível aplicabilidade dos compostos fenólicos obtidos pela extração em produtos alimentares (Dias et al., 2015).

### ***2.2.1. Técnicas de extração***

A literatura não parece definir um solvente específico para a extração de compostos fenólicos e, aponta a polaridade dos compostos a serem extraídos como um dos principais fatores a ter em consideração na escolha do solvente uma vez que influencia diretamente a extração. As soluções ideais são formadas com solutos apolares em solventes também apolares. Os compostos podem ser extraídos numa ordem crescente de solventes como: éter etílico > etanol > água ou hexano/diclorometano > acetato de etilo > metanol > água. (Shao et al., 2014; Broinizi et al., 2007; Martins et al., 2013). Tendo em conta essas características, são várias as técnicas de extração que têm vindo a ser exploradas, como a extração assistida por ultrassons e micro-ondas, extração por Soxhlet, maceração, entre outras.

Geralmente, para técnicas clássicas de extração como a extração por Soxhlet, a eficiência de extração depende principalmente do tipo de solvente aplicado. No caso de técnicas mais modernas de extração, como a extração assistida por ultrassom ou assistida por micro-ondas, a eficiência de extração não depende apenas do tipo de solvente, mas também de diferentes parâmetros característicos para cada uma dessas mesmas técnicas (Wilga, Kot-Wasik, & Jacek Namiesnik, 2007). A simplicidade e o baixo custo da técnica de extração por Soxhlet, aliado ao facto de se conseguir extrair mais massa de amostra do que a maioria das tecnologias de extração mais recentes são algumas das vantagens mais apontadas na literatura (Luque de Castro & Priego-Capote, 2010).

A técnica de extração por maceração consiste nos princípios de difusão e osmose. A amostra (vegetal ou animal) é colocada em contacto com um solvente adequado (líquido extrator), sob agitação durante um determinado tempo. No primeiro momento o extrator dissolve-se na superfície da amostra promovendo uma concentração intra e extracelular da mesma igualdade. Posteriormente, ocorre uma difusão molecular do soluto do interior da amostra para o solvente. A agitação promove uma melhor homogeneização deste processo de transição e, conseqüentemente, uma maior eficiência de extração (Fontes, 2013). O resveratrol é um composto fenólico encontrado

principalmente em vinhos tintos devido ao processo de maceração e fermentação alcoólica que ocorrem durante o processo de obtenção do vinho (Terra et al., 2011).

A extração assistida por calor (HAE), ainda que seja uma técnica mais tradicional, envolve um protocolo mais simples sem a exigência de tecnologias mais caras que muitas vezes não estão facilmente disponíveis para pequenas empresas.

A extração assistida por ultrassom (UAE), é realizada geralmente em banhos de ultrassom ou extratores fechados providos com sonda, e consiste na aplicação de vibrações mecânicas nas amostras líquidas, sólidas e gasosas, através de ondas sonoras de frequência acima de 20 kHz. O ultrassom promove o fenômeno denominado de cavitação que induz a formação de bolhas que se rompem variando a pressão e temperatura durante o processo. Portanto, as variáveis do processo permitem o rompimento estrutural da amostra e a redução das partículas promovendo assim uma extração rápida e eficiente (Cass & Cassiano, 2015).

A extração assistida por micro-ondas (MAE) é considerada ecologicamente viável devido ao seu baixo consumo de solvente ou até mesmo isento deste. O processo MAE é rápido e eficiente, com a possibilidade de realizar a extração em amostras complexas, proporcionando uma alta reprodutibilidade e uma menor manipulação das amostras. A extração consiste na liberação de energia para o solvente e na amostra de forma tão rápida que, promove o aumento homogêneo da temperatura, ocorrendo uma ruptura na estrutura da amostra libertando os seus possíveis constituintes. O aquecimento ocorre devido a interação que ocorre com as moléculas da amostra, por exemplo, a água. Entretanto é comumente utilizado solventes que possuem uma constante dielétrica alta, como a água, metanol e etanol (Cass & Cassiano, 2015).

Segundo alguns autores, a extração com uso de dióxido de carbono supercrítico para isolamento de compostos, apresenta inúmeras vantagens quando comparada com solventes orgânicos, o que tem levantado muito interesse por parte das indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética (Zizovic et al., 2007). O dióxido de carbono é o solvente mais utilizado uma vez que é definido como não-tóxico, não-inflamável, não-explosivo, com baixo custo e facilmente disponível para além de ser facilmente removível dos materiais extraídos (Chiu et al., 2002).

Apesar de todas as técnicas apresentarem vantagens e desvantagens umas em relação às outras, não é possível destacar nenhuma como sendo a melhor técnica. São vários os fatores que vão influenciar a escolha da técnica, como sendo o tipo de

compostos que pretendemos extrair, as condições que vão ser escolhidas e a forma como essas podem influenciar a extração desses mesmos compostos.

### **2.2.2. Biodisponibilidade e estabilidade**

Considera-se biodisponibilidade de determinado composto a fração que atinge o sistema circulatório, diretamente relacionado com o grau de absorção (Carbonell-Capella et al., 2014). A biodisponibilidade e estabilidade dos compostos fenólicos após injeção, é um tema amplamente estudado e discutido de forma a entender melhor os mecanismos de ação dos fenóis no organismo (Crozier et al., 2010).

Um dos fatores mais importantes a ter em consideração quando se fala na biodisponibilidade de compostos fenólicos, são as características químicas estruturais dos compostos fenólicos (Karakaya, 2004). As moléculas de açúcar ligadas aos compostos fenólico são um dos fatores que mais influenciam a absorção no intestino, em relação à sua natureza e número. Adicionalmente alguns fatores externos, como o facto de o organismo humano carecer de muitos recetores específicos na superfície das células epiteliais do intestino delgado para vários compostos fenólicos, limitam a sua absorção, sendo secretados na urina e nas fezes (Li et al., 2015).

Quanto à estabilidade dos compostos fenólicos, na escolha da técnica e condições ótimas de extração deve-se ter em consideração o facto de diversos fatores externos poderem levar à degradação de compostos, tais como temperatura, pH e luz.

A literatura estabelece que diferentes valores de pH provocam alterações na cor apresentada por antocianinas (Garzón, 2008). Do mesmo modo, o aumento da temperatura pode provocar alterações na estrutura química resultando na diminuição da sua estabilidade (Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán, 2015). Alguns autores descrevem que a influência da radiação luminosa acelera a degradação desses mesmos compostos (Sun et al., 2011). Devido à influência estabelecida por estes diferentes fatores, a otimização das técnicas e condições de extração estão a ser rotineiramente estabelecidas. Por exemplo, um estudo recente visou otimizar as condições de extração de antocianinas a partir de frutos de *A. unedo* com o objetivo de provar o seu potencial corante na indústria de pastelaria (Lopez et al., 2019). No entanto, um estudo desenvolvido por Silva et al. (2016), demonstrou que o armazenamento de polpa de amora (*Morus nigra* L.) por congelação a -18°C durante 90 dias, provocou perdas

significativas na ordem dos 40% de cianidina-3-*O*-glucósido. Desta forma, foi possível confirmar que durante o processo de congelamento, as reações metabólicas não são totalmente inibidas, mas apenas reduzidas.

A técnica de microencapsulação é apresentada como uma solução viável na proteção dos compostos fenólicos. Esta técnica baseia-se na utilização de agentes encapsulantes, capazes de revestir substâncias como os compostos fenólicos. Deste modo, a microencapsulação é de grande importância para a área alimentar, sendo utilizada para diversos fins, sendo que alguns destes estão referenciados na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Exemplos de microencapsulação de compostos fenólicos.

<b>Composto fenólico</b>	<b>Material encapsulante</b>	<b>Método</b>	<b>Referência</b>
<b>Ácido gálico</b>	Maltodextrina	Spray drying	Garcia, 2016
<b>Antocianinas</b>	Goma de cajueiro e maltodextrina	Spray drying	Moreira, 2007
<b>Apigenina</b>	Alginato	Atomização/coagulação	Oliveira, 2015
<b>Quercetina</b>	Goma arábica e maltodextrina	Spray drying	Barreto, 2015

A escolha do material encapsulante e da técnica de encapsulamento é uma das etapas mais importantes e decisivas para garantir que o agente ativo seja protegido e apenas libertado no local alvo definido uma vez que, essa libertação deverá ocorrer aquando de diferentes estímulos como temperatura e pH (Dias, Caleja, Ferreira & Barreiro, 2017).

### **2.2.3. Aplicação nos produtos alimentares**

Por lhe serem associadas propriedades medicinais com capacidade de atuar na prevenção e melhoria de determinadas sintomatologias, os ingredientes bioativos naturais têm sido utilizados mundialmente, desde tempos ancestrais (Dai & Mumper, 2010; Rubió, Motilva & Romero, 2013). Deste modo, as propriedades funcionais de alguns compostos naturais têm despertado o interesse crescente não só da comunidade científica como também da indústria alimentar, uma vez que a sua incorporação em diferentes alimentos se poderá traduzir num valor acrescido. Algumas fontes naturais de origem vegetal, animal ou micológica, mas também compostos sintéticos com atividades biológicas melhoradas têm vindo a ser explorados. Alguns exemplos de

ingredientes bioativos incluem vitaminas, aminoácidos, fibras, ácidos gordos e compostos fenólicos (Branen, Davidson, Salminen & Thorngate, 2001).

Para responder às necessidades e exigências dos consumidores, que estão cada vez mais preocupados com os seus hábitos alimentares, a indústria alimentar tem vindo a desenvolver diferentes produtos alimentares fortificados, incorporando ingredientes ativos na dosagem correta, e sem alteração das propriedades organolépticas e de textura dos produtos (Carocho, Barreiro, Morales & Ferreira, 2014; Aun et al., 2011).

As plantas medicinais e aromáticas têm tido uma elevada procura nesta área de desenvolvimento de novos alimentos funcionais devido à elevada quantidade de compostos fenólicos na sua composição. Çam et al. (2014) incorporaram extratos fenólicos de romã em gelados com o objetivo de lhe conferir propriedades antioxidantes. Também Chouchouli et al. (2013) e Martins et al. (2014), incorporaram sementes de uva e flores de amoreira, respetivamente, de forma a funcionalizar iogurtes. Estudos desenvolvidos com extratos fenólicos de funcho e camomila em requeijão, descrevem uma atividade antioxidante superior e um aumento do tempo de prateleira, comparativamente com o requeijão sem extratos (Caleja et al., 2015a, Caleja et al., 2015b). Na mesma matriz alimentar, a incorporação de cogumelos surge para melhorar as propriedades antioxidantes (Ribeiro et al., 2015).

Por ser uma excelente fonte de compostos antioxidantes, como compostos fenólicos, e de amido, a farinha de banana verde (FBV) tem sido amplamente utilizada como ingrediente funcional na elaboração de diferentes produtos alimentares tal como apresentado na **Tabela 7**.

**Tabela 7.** Alimentos funcionais elaborados com farinha de banana verde.

<b>Produto</b>	<b>Composição</b>	<b>Referência</b>
Pão	Farinha de trigo: FBV (90:10).	Juarez-Garcia et al., 2006
Biscoito	0% (controlo), 10, 20 e 30% de FBV.	Fasolini et al., 2007
<i>Snacks</i>	<i>Snacks</i> de mandioca: 0, 10, 20, 30, 40,50 g de FBV/100g de amido de mandioca.	Wang et al., 2012
<i>Nuggets</i>	Adição de 0% (controlo), 3%, 4% e 5% de FBV.	Kumar et al., 2013
Bolo	Substituição da farinha de trigo por 60% de FBV.	Borges et al., 2010
Macarrão	47,5% de FBV; 31,5% de ovos; 16,4% de água; 2,5% de goma guar e 2,5% de goma xantana.	Zandonadi et al., 2012

Tabela baseada em Silva et al., (2016)

No desenvolvimento e comercialização de novos alimentos funcionais, a indústria alimentar terá de ter em conta uma diversidade de fatores tais como, a aceitação sensorial, preço, estabilidade, propriedades químicas e funcionais dos produtos alimentares (Betoret et al., 2011). No entanto, para o desenvolvimento destes produtos é necessário ter em consideração que o processo de produção deverá ser rápido, sendo necessário ter em consideração todas as exigências das evidências científicas para serem introduzidos no mercado (Roy, 2015; Wang & Li, 2015). Além disso, é necessário que os consumidores tenham conhecimento e estejam familiarizados com os alimentos funcionais e com a segurança dos mesmos (Annunziata & Vecchio, 2011; Verschuren, 2002).

No entanto, o sucesso dos alimentos funcionais também depende dos atributos organoléticos, especialmente sabor, aparência, preço e alegações para a saúde (Routray & Orsat, 2012). Portanto, considera-se que para garantir o sucesso desta categoria de alimentos, é necessário um trabalho conjunto de vários setores como a ciência, indústria, mercado, meios de comunicação, educação e políticas governamentais (Wang & Li, 2015).

### **2.3. APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS NA INDÚSTRIA AGROALIMENTAR**

Existe uma preocupação crescente por parte da indústria agroalimentar relativamente ao aproveitamento de resíduos, uma vez que anualmente são geradas toneladas de resíduos normalmente descartados de uma forma inadequada para o meio ambiente. Assim, existe uma grande quantidade de resíduos resultante do processamento de grãos, frutos e hortaliças, com um grande potencial de reaproveitamento (Woiciechowski et al., 2013).

A utilização de soro de leite tem sido um desafio desde que o homem começou a fabricação de queijo. Atualmente, existem diversas formas de aproveitamento do soro, tais como preparados para alimentação animal, ingrediente para fabricação de produtos alimentares nomeadamente, bebidas lácteas e requeijões, o que tem resultado num aproveitamento muito satisfatório para a indústria deste setor (Santos & Ferreira, 2001).

Os resíduos gerados durante o processamento do ananás (*Ananas cosmosus*) têm sido apontados como fontes ricas em compostos bioativos de interesse e

consequentemente, despertado interesse na indústria alimentar. Este tipo de resíduos para além de serem utilizados como aditivos através da sua aplicação direta em alimentos, têm sido utilizados também como material para a produção de revestimentos de frutos e hortaliças após colheita (Schieber, Stintzing & Carle, 2001).

De acordo com Moreira (2007), o “bagaço” gerado durante o processamento da acerola, é um resíduo de cor vermelha constituído por elevada quantidade de antocianinas e ácido ascórbico, o que justifica o grande valor comercial que resulta do seu aproveitamento. Este resíduo tem vindo a ser utilizado por exemplo, na produção de um extrato microencapsulado para aplicação na área alimentar como ingrediente funcional com propriedades antioxidante e/ou corante.

Desta forma, o aproveitamento de resíduos agroindustriais, tem vindo a ser amplamente estudado com vista a agregar valor a matrizes de baixo valor comercial. São vários os resíduos resultantes do processamento de matrizes naturais que têm sido apontados como excelentes fontes de compostos fenólicos apresentando atividades bioativas com interesse para a indústria alimentar, visando a sua utilização como ingrediente funcional (Barreto, 2015).

### ***2.3.1. Problemática dos resíduos na indústria agroalimentar***

De acordo com a Agência Portuguesa do Ambiente (2019), classifica-se como resíduo, “qualquer substância ou material descartado por um detentor, o qual tem a intenção ou obrigação de se desfazer do mesmo”. A Lista Europeia de Resíduos (LER) obriga todos os detentores a classificar os resíduos como perigosos e não perigosos.

A indústria agroalimentar é apontada como uma das maiores produtoras de resíduos, tanto animais como vegetais. Esses resíduos apresentam materiais lenocelulósicos, resíduos vegetais, gordura animal, óleos vegetais, resíduos de pepel, resíduos ricos em proteínas, entre outros (Schievano et al., 2009).

Um dos principais problemas das atividades industriais de processamento de alimentos como as processadoras de sumo de frutos, está relacionado com a produção de grande volume de resíduos sólidos e líquidos. O descarte inadequado deste tipo de resíduos (cascas, polpas e sementes) representa um elevado risco ambiental, nomeadamente na poluição da água e do solo que poderá ter diversas consequências graves na saúde humana e animal (Farhat et al., 2011).

Do mesmo modo, a indústria produtora de carne apesar de apresentar um papel de grande relevância económica, tem vindo a levantar várias questões preocupantes relacionadas com a gestão de resíduos nos efluentes. A grande quantidade de sangue, gordura, sólidos do conteúdo intestinal dos animais e fragmentos de tecidos levanta questões preocupantes de impacto ambiental (Araújo & Costa, 2014).

No Brasil, a indústria sucroenergética é considerada de grande importância na economia do país, porém esta também representa um impacto ambiental bastante negativo, relacionado com a produção de resíduos durante o processamento industrial da cana de açúcar, geradora de resíduos como a vinhaça, bagaço, a torta de filtro ou flegmaça. Adicionalmente, neste sector agroindustrial, o uso abundante de água para cultivo e as etapas de produção de açúcar e etanol, geram efluentes da lavagem de pisos e equipamentos, que podem provocar impactos significativos ao meio ambiente (Ana, 2009).

Em Portugal, a prática agrícola da poda da vinha, do olival e das árvores frutíferas é a principal responsável pela produção de resíduos. Das culturas agrícolas permanentes, os resíduos são provenientes das podas de plantas arbóreas como o castanheiro, amendoeira, kiwi, árvores de citrinos, pessegueiro entre outros. Por sua vez da manutenção de culturas temporárias, são gerados resíduos como palha de trigo, de aveia, cevada e arroz (Ibero Massa Florestal, 2014). O descarte dos resíduos da poda é feito diretamente no solo e por isso, considerado como impacto ambiental negativo uma vez que, o processo de degradação é lento e dificulta a absorção pelo solo, quando o resíduo está *in natura*, ou seja, sem a prévia trituração (Cortez, 2011).

Alguns autores sugerem o elevado potencial destes resíduos com vista ao aproveitamento destes no fornecimento de energia elétrica e térmica, através do tratamento e produção de biogás (Jayachandra et al., 2011).

A Itália, a Alemanha e a Áustria são exemplos de países que utilizam resíduos agroindustriais de uma forma sustentável a baixo custo e rápido acesso para a obtenção de energia através da biomassa (Schievano et al., 2009). No Brasil, a inserção de novas fontes renováveis de energias nomeadamente, a utilização de biomassa tem sido vista com grande potencial de crescimento nesta área em relação às condições climáticas favoráveis do país, disponibilidade de água e grande extensão de áreas agrícolas (Ruiz, 2015). No entanto, existe alguma controvérsia relativamente à quantidade de biomassa produzida, pelo facto de poder haver um comprometimento na produção de alimentos e,

também, relativamente à quantidade de resíduos alimentares tóxicos que resultam na contaminação de solos e águas (Ferreira, 2015).

### ***2.3.2. Caso particular dos bioresíduos de casca de kiwi***

As perdas e os desperdícios de alimentos acontecem ao longo de toda cadeia produtiva, desde a colheita no campo até à mesa do consumidor. Estima-se que um terço dos alimentos produzidos no mundo para o consumo humano é desperdiçado ou perdido, isto representa cerca de 1,3 bilhão de toneladas de alimentos. Os frutos e vegetais são as classes de alimentos que apresentam maiores perdas e desperdícios, cerca de 40-50% em relação a outros alimentos (FAO, 2019).

No Brasil, 10% da grande parte do desperdício de alimentos, está relacionado com a colheita no campo. Etapas de transporte e industrialização traduzem-se em 50% das perdas, sendo que os desperdícios que ocorrem nas residências dos consumidores são cerca de 10% e os restantes 30% que se somam, são perdidos no retalho (Roriz, 2012). A Europa desperdiça cerca de 222 milhões de toneladas de alimentos por ano, quantidade essa que representa aproximadamente a produção de alimentos da África subsaariana, que produz 230 milhões de toneladas (FAO, 2019).

Na indústria de processamento de frutos, a água é utilizada em quase todas as etapas da produção, desde a etapa inicial onde se tem a lavagem e sanitização dos frutos, durante o processo com a adição de água aos sumos para possíveis diluições, como também no término do processo, realizando a lavagem dos equipamentos como as caldeiras, despulpadoras, refrigeradores e entre outros (Paula, 2013). As águas residuais resultantes do processamento de frutos, são ricas em material orgânico, nutrientes e sais minerais, representando um elevado potencial poluente quando descartados de forma inadequadas, podendo resultar em odores, pragas e contaminação dos solos e água (Jeronimo, 2012).

Segundo a Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011, os efluentes de qualquer fonte poluidora apenas poderão ser lançados diretamente no corpo receptor se obedecerem às condições e padrões previstos nomeadamente, a remoção mínima de 60% da Carência Bioquímica de Oxigênio (CBO). Define-se por CBO, a quantidade de oxigênio por unidade de volume de um resíduo, necessária para a oxidação bioquímica

da matéria orgânica, até obter a sua estabilização, sob condições de tempo e temperatura (geralmente estimada após 5 dias de incubação a 20°C), utilizando microrganismos e sendo expressa em mg/L (Villen, 2001). A **Tabela 8** apresenta valor da CBO para diferentes tipos de efluente

**Tabela 8.** CBO de diferentes tipos de efluentes.

<b>Efluentes</b>	<b>CBO (mg/L)</b>	<b>Referência</b>
<b>Esgoto doméstico</b>	350	Villen, 2001
<b>Despolpa de café</b>	1.840 – 14.340	Matos & Lo Monaco, 2003
<b>Indústria de conserva de frutos e legumes</b>	200 – 3.000	Von Sperling, 2005
<b>Indústria de laticínios</b>	1.400	Mendonça, 2017
<b>Matadouros</b>	150.000 – 200.000	Pardi et al., 1995
<b>Pescados</b>	1.700	Giordano, 2004

O aproveitamento de resíduos e subprodutos oriundos do processamento de frutos e hortaliças, é uma prática sustentável que reduz significativamente os impactos ambientais causados como pelo acúmulo de lixo orgânico. Além disso, o aproveitamento integral dos alimentos promove o desenvolvimento de novos produtos, com formulações de alto valor nutricional, garantindo a segurança alimentar e podendo ainda auxiliar na renda familiar (Roriz, 2012).

As indústrias processadoras de frutos e vegetais, são responsáveis pela produção de toneladas de resíduos agroindustriais. Os principais resíduos gerados pelo processamento de frutos e vegetais são os de bagaços, cascas e sementes, provenientes de etapas como esmagamento, despolpamento, entre outros. A **Tabela 9**, apresenta os valores de resíduos provenientes do processamento de diversos frutos e vegetais.

**Tabela 9.** Percentual de resíduos obtidos em diferentes processos.

Produtos	Resíduos (%)	Referência
Sumo de Laranja	50	Teixeira, 2001
Sumo de Maracujá	70	Mendes, 2018
Sumo de Acerola	31,24	Caetano et al., 2011
Polpa de Kiwi	30	Iensen et al., 2013
Polpa de Acerola	26,32	Caetano et al., 2011
Conserva de Minimilho	74,1	Raupp et al., 2008

De acordo com Coelho (2015), em média 25% de todo o kiwi produzido é perdido durante a produção, estas perdas estão relacionadas com danos provocados por impacto, abrasão, cortes e compressão ao longo das etapas de colheita, armazenagem e transporte, além de incidentes por falhas nos sistemas de refrigeração. Entretanto, existem iniciativas por parte dos produtores em comercializar e/ou valorizar o material que é perdido ou descartado, nomeadamente no aproveitamento para a produção de sumos ou compotas.

### ***2.3.3. Extração de compostos fenólicos de kiwi***

De acordo com Park et al., (2014), a espécie e a variedade vai definir a quantidade de compostos fenólicos encontrados no fruto de kiwi. A

**Tabela 10** apresenta os valores de polifenóis totais, flavonoides totais, flavanóis totais e vitamina C nos frutos de *Actinidia* onde se confirma que existem variações na composição dependendo da espécie (Du et al, 2009). Além disso, o ponto de maturação, as condições ambientais e as manipulações inadequadas dos frutos, são fatores que podem também provocar alterações nas propriedades nutricionais e químicas do kiwi (Singletary, 2012).

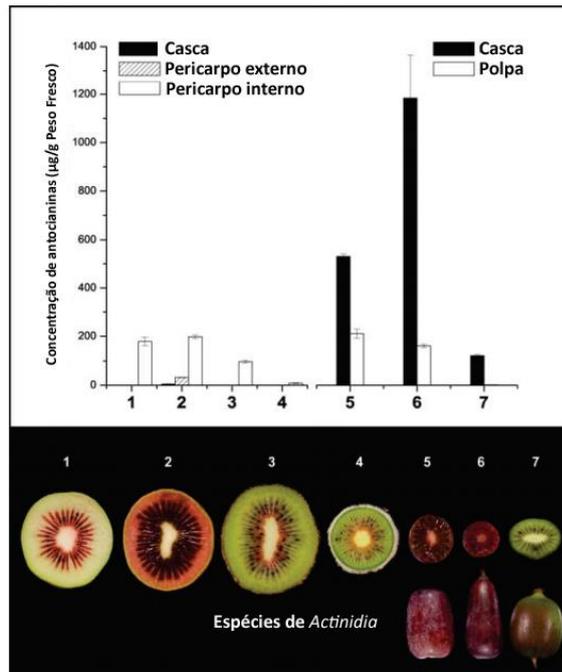
**Tabela 10.** Quantificação dos compostos fenólicos em extratos de 8 genótipos de Actinidia.

Cultivares	Polifenóis totais	Flavonoides	Flavanóis	Vitamina C
<i>A. eriantha</i>	329,33	6,64	3,01	1284,87
<i>A. rufa</i>	195,00	38,94	42,58	41,74
<i>A. latifolia</i>	710,00	74,24	91,79	1322,91
<i>A. chinensis</i> cv. Hongyang	136,67	17,96	18,68	73,97
<i>A. chinensis</i> cv. Xixuan	70,67	14,28	17,76	42,27
<i>A. deliciosa</i> cv. Jinkui	107,33	9,73	8,94	166,44
<i>A. deliciosa</i> cv. Qinmei	96,67	11,15	10,50	129,81
<i>A. deliciosa</i> cv. Hayward	41,67	6,69	4,34	63,41

Polifenóis total (mg ácido gálico/100 g Peso Fresco); Flavonoides total (mg rutina/100 g Peso Fresco); Flavanóis total (mg catequina/100 g Peso Fresco); Vitamina C (mg ácido ascórbico/100 g Peso Fresco). Fonte: adaptado de (Du et al, 2009).

Como referido anteriormente, vários estudos realizados comprovam que o solvente utilizado no método de extração vai influenciar a extração de compostos bioativos e o nível de capacidade antioxidante demonstrado. O etanol, a acetona, o metanol e a combinação dos mesmos com diferentes proporções de água são os solventes mais utilizados para a extração destes compostos (Park et al., 2013), sendo a extração por maceração o processo mais aplicado (Farinha, 2014).

As cascas e sementes de frutos são considerados resíduos ou subproduto, que normalmente apresentam maior valor nutricional, quando comparados com o restante fruto. Os compostos fenólicos podem estar em maior quantidade nos resíduos, apresentando conseqüentemente um maior potencial antioxidante do que a polpa (**Figura 3**) (Gondim *et al.*, 2005). A polpa de kiwi possui uma grande quantidade de antioxidantes benéficos para a saúde do consumidor. Ácidos hidroxicinâmicos, procianidinas e quercetina glicosilada, são descritos na literatura como sendo os compostos maioritários na composição da casca de kiwi (Pinelli *et al.*, 2013).



**Figura 3.** Relação da quantidade de antocianinas encontradas em diferentes partes do fruto de diferentes espécies de kiwi: *A. chinensis* (1 e 2), *A. deliciosa* (3), *A. eriantha* (4), *A. melanandra* (5), *A. arguta* var. *purpurea* (6), e *A. arguta* (7). Fonte: adaptado de Montefiori et al. (2009).

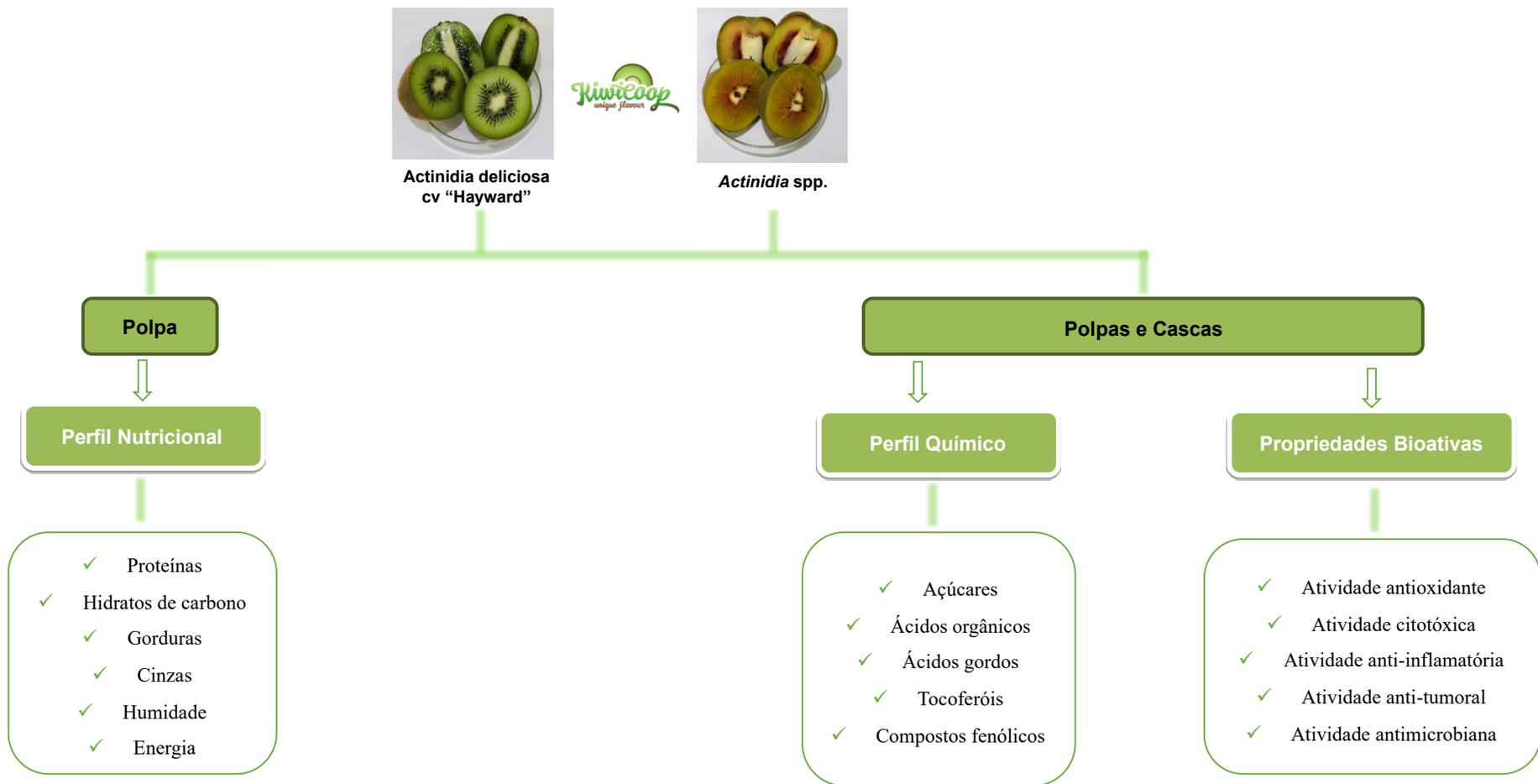
Segundo Montefiori et al., (2009), na caracterização e quantificação de antocianinas da *Actinidia spp.* (polpa vermelha) são encontrados cianidina 3-(2-(xilosil) galactósido), cianidina 3-galactósido, cianidina 3-glucósido, delphinidina 3-(2-(xilosil) galactósido), e delphinidina 3-galactósido (Wojdyło et al., 2017). Relativamente à extração de antocianinas, verifica-se que para além do solvente algumas variáveis como o tempo e temperatura também influenciam o rendimento e a eficiência de uma extração (Machado et al., 2013).

## 2. OBJETIVOS

Neste trabalho pretendeu-se caracterizar os a polpa e casca de kiwi de duas variedades distintas (kiwi verde e kiwi vermelho), de forma a aproveitar um bio resíduo para a obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos para posterior incorporação na indústria alimentar. O plano de trabalho encontra-se esquematizado na **Figura 4**.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- i) Determinação do valor nutricional das polpas de ambas as variedades de kiwi através de metodologias oficiais de análise de alimentos (AOAC);
- ii) Determinação da composição química, analisando o teor em açúcares livres, ácidos gordos, ácidos orgânicos e tocoferóis tanto das polpas como das cascas de ambas as variedades de kiwi;
- iii) Caracterização e quantificação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos e a um detetor de espectrometria de massa com uma fonte de ionização por espalhamento de eletrões (HPLC-DAD-ESI/MS);
- iv) Avaliação de diferentes propriedades bioativas das polpas e cascas:
  - Potencial antioxidante por diferentes ensaios *in vitro*: inibição da peroxidação lipídica (TBARS- espécies reativas do ácido tiobarbitúrico- em homogeneizados cerebrais) e atividade anti-hemolítica (ensaio de inibição da hemólise oxidativa - OxHLIA);
  - Potencial citotóxico em linhas celulares tumorais humanas (carcinoma hepatocelular - HepG2, cervical - HeLa, pulmão - NCI-H460 e mama - MCF-7) e em culturas primárias de células de fígado de porco (não tumorais- PLP2), pelo método da sulforrodamina B (SRB).
  - Atividade antimicrobiana: atividade antibacteriana avaliada pelo método de microdiluição com o corante INT (cloreto de iodonitrotetrazólio) e atividade antifúngica pelo método de diluições sucessivas.
  - Atividade anti-inflamatória em células macrófagas RAW 264.7 de rato.



**Figura 4.** Representação esquemática dos objetivos do presente trabalho.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Preparação das amostras

Os frutos de *Actinidia deliciosa* cv “Hayward” (kiwi verde) e *Actinidia* spp. (kiwi vermelho) foram gentilmente cedidos pela empresa Kiwicoop, com sede em Oliveira do Bairro, Portugal. As cascas foram finamente separadas da polpa e após congeladas foram desidratadas por liofilização (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EE.UU.) De seguida, as amostras foram trituradas e o pó misturado para garantir a homogeneidade das amostras e, foram armazenadas num local fresco e seco ao abrigo de luz, para posteriores análises (**Figura 5**).

 <i>Actinidia deliciosa</i>	Polpa		
	Casca		
 <i>Actinidia</i> spp.	Polpa		
	Casca		

**Figura 5.** Amostras antes e após o processo de liofilização.

### 3.2. Reagentes

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

A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (C4-C24; norma 47885-U) foi adquirida na empresa Sigma (St. Louis, MO, USA), assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos, padrões de açúcares ((D(-)-frutose D(+)-sacarose, D(+)-glucose, D(+)-trealose e D(+)-rafinose pentahidratada), padrões de ácidos orgânicos (L(+)-ácido ascórbico; ácido cítrico; ácido málico; ácido oxálico; ácido shiquimico; ácido succínico; ácido fumárico e ácido quinico) e padrões de tocoferóis (isoformas  $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\lambda$  e  $-\delta$ ). Relativamente aos padrões dos compostos fenólicos utilizados: ácido cafeico, catequina, epicatequina, quercetina-3-*O*-glucósido e cianidina-3-*O*-glucósido foram adquiridos nas empresas Sigma-Aldrich, Extrasynthese e Polyphenols.

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

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

### 3.3. Determinação do valor nutricional das polpas de *Actinidia deliciosa* cv “Hayward” e *Actinidia* spp.

A composição em macronutrientes de ambas as polpas foi obtida através de metodologias oficiais de análise de alimentos (AOAC, 2016), seguindo a metodologia previamente descrita por Melgar et al., 2017. Para tal, foi determinado o teor de proteína, gordura, hidratos de carbono, cinzas, humidade e energia.

O teor em proteínas ( $N \times 6.25$ ) foi obtido pelo método macro-Kjeldahl (AOAC 991.02), o qual se baseia na quantidade de azoto presente na amostra. Para tal, adiciona-se ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) à amostra (0,5 g) ocorrendo, desta forma, a digestão da matéria orgânica e conseqüente formação de um sal inorgânico, o sulfato de amónio  $(NH_4)_2SO_4$ , no qual é retido o azoto. De seguida, alcaliniza-se a solução por adição de hidróxido de sódio (NaOH), que potencia a libertação de azoto na forma de amoníaco,  $NH_3$ . O amoníaco é, de seguida, destilado e recolhido numa solução de ácido conhecido, neste caso,  $H_2SO_4$  (0,1 M). Por fim, é feita uma titulação com NaOH (0,1 M), utilizando um indicador de metil vermelho, que permite quantificar o azoto presente na amostra (AOAC 991.02).

Os lípidos foram determinados através da extração de uma massa conhecida de amostra (3g), num aparelho de Soxhlet, para a qual se utilizou como solvente de extração o éter de petróleo a uma temperatura de aproximadamente 120 °C, durante 7 horas (AOAC 989.05).

Para a obtenção do teor em cinzas, fez-se uma incineração a  $600 \pm 15^\circ C$  durante 12 horas (AOAC 935.42).

Para a determinação da humidade presente na amostra, colocou-se uma quantidade conhecida de amostra (1g) na estufa (100 °C) até se obter uma massa constante.

Os glúcidos foram calculados por diferença, enquanto que a energia total foi determinada de acordo com a **equação 1**, apresentada abaixo.

$$Energia (Kcal) = 4 \times (g_{proteinas} + g_{glúcidos}) + (9 \times g_{gordura})$$

**Equação 1.** Equação para determinação da energia total.

### **3.4. Determinação da composição química das polpas e cascas de kiwi verde e kiwi vermelho**

#### **3.4.1. Açúcares**

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito anteriormente por Barros et al. (2013a).

A amostra (1 g) foi enriquecida com melezitose (utilizada como padrão interno, 25 mg/mL) e extraiu-se com 40 mL de etanol (80/20, v/v), num banho a 80 °C (Julabo, SW22; Seelbach, Germany), durante 1 hora e 30 min, com agitação a cada 15 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante obtido foi centrifugado (Centrífuga refrigerada K24OR, Centurion, Sussex Ocidental, Reino Unido) a 15.000 g durante 10 minutos e transferido para um balão de vidro para evaporar a fração etanólica, recorrendo-se ao evaporador rotativo (Evaporador rotativo Büchi R-210, Flawil, Suíça) (60 °C, pressão reduzida). A fase aquosa foi lavada 3 vezes com éter dietílico (10 mL), tendo sido, seguidamente, os restos do mesmo evaporados. Ao resíduo seco obtido, foi adicionada água até perfazer um volume final de 5 mL e filtrou-se 1,5 mL do mesmo (filtros de nylon - 0,2 µm, Whatman) para um vial, para posterior análise do perfil em açúcares no sistema HPLC.

O sistema de HPLC encontra-se equipado com uma bomba (Knauer, Sistema Smartline 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco, Easton, Maryland, EUA) e um detetor de índice de refração (Knauer Smartline 2300). A separação cromatográfica foi obtida através de uma coluna Eurospher 100-5 NH<sub>2</sub> (4.6 x 250 mm, 5 mm, Knauer), que operou a uma temperatura de 30 °C (7971 R Grace).

Como fase móvel foi usado acetonitrilo/água desionizada (70:30; v/v) com um caudal de 1 mL/min. Para a identificação dos compostos, recorreu-se ao software Clarity 2.4 Software (DataApex), a partir do qual se compararam os tempos de retenção relativos dos picos da amostra, com padrões conhecidos. Os resultados foram obtidos pelo método do padrão interno e expressos em grama de composto por 100 g de massa fresca.

### 3.4.2. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de fotodíodos (UFLC-PDA), de acordo com um procedimento previamente descrito por Barros et al. (2013b).

A extração foi realizada ao abrigo da luz adicionando 25 mL de ácido metafosfórico (4,5%) à amostra (1,5 g), mantendo as condições de temperatura de 25 °C e agitação constante (150 *rpm*) durante 45 minutos. Após extração, a mistura foi filtrada através de papel de filtro (Whatman N ° 4) e, posteriormente, através de filtros de nylon (0,2 µm; Whatman) para análise em UFLC (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). A separação dos mesmos foi obtida através de uma coluna SphereClone (Phenomenex, Torrance, California, EUA) de fase inversa C<sub>18</sub> (5 µm, 250 mm × 4,6 mm i.d.) termostaticada a 35 °C, sendo a eluição realizada com ácido sulfúrico (3,6 mM) com um caudal de 0,8 mL/min.

A detecção dos ácidos orgânicos foi conseguida recorrendo a um sistema DAD, aplicando um comprimento de onda de 215 nm (e 245 nm para o ácido ascórbico). A quantificação dos compostos foi efetuada por comparação da área dos seus picos registados, nos comprimentos de onda referidos anteriormente, com as curvas de calibração obtidas a partir dos padrões do respetivo composto. Os resultados foram expressos em mg de composto por 100 g de massa fresca.

### 3.4.3. Ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), como descrito anteriormente por Pereira et al. (2012).

Ao extrato lipídico obtido previamente por extração em Soxhlet, foram adicionados 5 mL de uma solução de metanol/ácido sulfúrico/tolueno, na proporção 2:1:1 (*v/v/v*) e a mistura permaneceu num banho (Julabo, SW22; Seelbach, Alemanha) a 50 °C (com agitação de 160 *rpm*) durante aproximadamente 12 h. Após retirar os tubos do banho e, com o intuito de potenciar a separação de fases, foi adicionada água desionizada (3 mL) na mistura e, posteriormente, para recuperação dos esteres metílicos de ácidos gordos (FAME) adicionou-se éter dietílico (3 mL), ambos os passos com agitação em *vórtex*. Após separação das fases, transferiu-se o sobrenadante para um vial, no qual se adicionou previamente sulfato de sódio anidro, a fim de desidratar o sobrenadante. Por

último, filtrou-se o mesmo através de filtros de nylon (0,2 µm; Whatman) para um vial, para posterior análise em GC.

O perfil de ácidos gordos foi obtido através de um sistema de GC (Modelo DANI GC 1000) equipado com um injetor *split/splitless*, um detetor de ionização de chama (FID, 260 °C) e uma coluna Zebron-Kame column (30 m × 0,25 mm ID × 0,20 µm d<sub>f</sub>; Phenomenex, Lisbon, Portugal). O programa de temperatura aplicado foi o seguinte: temperatura inicial de 100 °C, durante 2 min; aumentos progressivos da temperatura: 10 °C/min até 140 °C; 3 °C/min até 190 °C; 30 °C/min até 260 °C que permaneceu durante 2 min. O gás de transporte utilizado foi o hidrogénio com um caudal de 1,1 mL/min, medido a 100 °C. A injeção *split* (1:50) foi realizada a 250 °C, onde foi injetado 1 µL da amostra.

A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos de FAME das amostras com padrões conhecidos. Para o processamento dos resultados, recorreu-se ao software CSW 1,7 (DataApex 1,7, Praga, República Checa) e estes foram expressos em percentagem relativa (%) para cada ácido gordo detetado.

#### **3.4.4. Tocoferóis**

Os tocoferóis foram analisados através de um sistema HPLC acoplado a um detetor de fluorescência (HPLC-FL), segundo um procedimento descrito por Barros et al. (2013a). Para realizar o processo de extração, à amostra (500 mg) foi adicionada uma solução de BHT em hexano (10 mg/mL; 100 µL) e uma solução de tocol (usado como padrão interno - PI) em hexano (50 µg/mL; 400 µL). A amostra foi, de seguida, homogeneizada com 4 mL de metanol (*vórtex*, 1 minuto) e ainda, com 4 mL de hexano (*vórtex*, 1 minuto). Após homogeneização da amostra, adicionou-se uma solução aquosa concentrada de NaCl (2 mL), homogeneizando-se (*vórtex*, 1 min) e centrifugando-se (5 min; 4000g; 10°C). O sobrenadante obtido foi transferido para um vial e re-extraído o mesmo duas vezes com hexano. Posteriormente, ao extrato obtido, adicionou-se sulfato de sódio anidro, a fim de desidratar o sobrenadante, que foi levado à secura sob corrente de azoto. Por fim, redissolveu-se o extrato obtido em n-hexano (2 mL) e filtrou-se através de um filtro nylon (0,2 µm; Whatman) para um vial âmbar para posterior análise.

O sistema HPLC (descrito previamente na secção 3.4.1) utilizado para a análise dos compostos, encontrava-se acoplado a um detetor de fluorescência (FP-2020; Jasco), programado para excitação ( $\lambda_{ex}$ ) a 290 nm e emissão ( $\lambda_{em}$ ) a 330 nm. A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna de fase normal Poliamida II (250 mm  $\times$  4,6 mm i.d.) (YMC Waters) com uma temperatura de 30 °C. Como fase móvel, usou-se uma mistura de n-hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com um caudal de 1 mL/min, sendo o volume de injeção de 20  $\mu$ L.

A identificação dos compostos foi realizada através de comparações cromatográficas de compostos padrão. A quantificação foi obtida pelo método do padrão interno, com base em curvas de calibração de compostos padrão. A análise de dados foi executada com o software Clarity 2,4 (DataApex) e os resultados foram expressos em mg de composto por 100 g de massa fresca.

### **3.4.5. Compostos fenólicos**

Para análise dos compostos fenólicos (antociânicos e não antociânicos) seguiu-se uma metodologia previamente descrita pelos autores Bessada et al. (2016) e Gonçalves et al. (2017).

#### **3.4.5.1. Compostos fenólicos não antociânicos**

As amostras liofilizadas (1g) foram submetidas a maceração com uma solução de etanol/água (80:20, v/v; 30 mL) à temperatura ambiente, com agitação magnética (150 rpm) durante 1 hora. Posteriormente, foi filtrada através de um papel de filtro (Whatman No. 4) e o processo foi repetido, sendo a amostra re-extraída com 30 mL da mesma solução hidroetanólica. Por fim, a fração alcoólica dos extratos obtidos foi evaporada a pressão reduzida (evaporador rotativo, Büchi R-210, Flawil, Suíça) e liofilizados (47 °C, 0.045 bar; FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA) para posteriores análises.

Para a análise do perfil fenólico, o extrato descrito, foi redissolvido numa concentração de 10 mg/mL com EtOH/H<sub>2</sub>O (20:80, v/v).

Para a análise cromatográfica foi utilizado um sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5 °C), um desgasificador e um compartimento de coluna com termóstato automatizado. A deteção dos compostos foi efetuada com detetor de díodos

(DAD), usando os comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm e acoplado a um detector de espectrometria de massa (MS).

Para a separação dos compostos, utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 de fase reversa C<sub>18</sub> (4,6 x 150 mm, 3 µm; Milford, EUA) termostaticada a 35 °C. A fase móvel utilizada foi (A) ácido fórmico/água (0,1%) e (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi isocrático: 10% a 15% B até 5 min, 15-20% B até 5 min, 20-25% B 10 min, 25-35% B 10 min, 35-50% B 10 min e reequilíbrio da coluna por 10 min; sendo definida uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. O sistema de HPLC descrito encontrava-se também interligado a um espectrômetro de massa (MS).

A detecção de MS foi feita utilizando uma espectrômetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA), equipada com uma fonte ESI (fonte de ionização electrospray). O gás de arraste utilizado foi azoto (50 psi); o sistema trabalhou com uma voltagem de spray de 5 kV, a uma temperatura inicial de 325 °C e tensão capilar de -20 V. A voltagem do *tube lens offset* foi mantida a -66 V. Os espectros foram gravados em modo de ião negativo entre 100 e 1500 *m/z*. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os dados foram recolhidos e analisados utilizando o programa Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA).

Para a identificação dos compostos procedeu-se à comparação dos dados obtidos (tempos de retenção, espectros UV-Vis e espectros de massa) com dados disponíveis na literatura e, quando disponíveis, com os padrões. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (2,5-100 µg/mL): ácido cafeico ( $y = 388345x + 406369$ ,  $R^2 = 0.9939$ ); catequina ( $y = 84950x - 23200$ ,  $R^2 = 1$ ); epicatequina ( $y = 10314x + 147331$ ,  $R^2 = 0.9994$ ); quercetina 3-O-glucoside ( $y = 34843x - 160173$ ,  $R^2 = 0.9988$ ), baseadas nos sinais UV-Vis e utilizando o comprimento de onda máximo de absorção de cada composto padrão. Nos casos em que não se verificou disponibilidade de padrões para os respetivos compostos, a quantificação foi feita através de curvas de calibração de compostos do mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg de composto por g de extrato.

#### 3.4.5.2. Compostos fenólicos antociânicos

As amostras liofilizadas (1g) foram submetidas a maceração à temperatura ambiente, com agitação magnética (150 *rpm*) durante 1 hora com uma solução de etanol/água

(80:20, v/v; 30 mL) acidificada com TFA (0,5%). Posteriormente, foi filtrada através de um papel de filtro (Whatman No. 4) e o processo foi repetido, sendo a amostra re-extraída com 30 mL da mesma solução hidroetanólica acidificada. Por fim, a fração alcoólica dos extratos obtidos foi evaporada a pressão reduzida (evaporador rotativo, Büchi R-210, Flawil, Suíça). Para a purificação da amostra, fez-se passar a fase aquosa resultante da evaporação do etanol, através de uma coluna C<sub>18</sub> SepPak<sup>®</sup> (Vac 3 cm<sup>3</sup>; Phenomenex, Califórnia, EUA), previamente ativada com 5 mL de metanol e, posteriormente com 5 mL de água. Os açúcares e as substâncias mais polares foram removidas com 15 mL de água e os compostos antociânicos foram eluídos com metanol (15 mL). O extrato foi concentrado, re-dissolvido numa solução de MeOH/H<sub>2</sub>O acidificado com 0,1% de TFA (80:20, v/v, 1 mL) e seguidamente, filtrados através de discos LC descartáveis de 0,22- $\mu$ m para posterior análise em HPLC (Rodrigues et al., 2012).

As antocianinas foram analisadas usando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Dionex UltiMate 3000 UPLC, Thermo Scientific) descrita na seção 3.5.5.1.. Para a separação dos compostos e recorreu-se a uma coluna de fase reversa AQUA<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 150 mm  $\times$  4,6 mm i.d., Phenomenex) termostaticada a 35 °C. Os solventes usados foram: (A) 0,1% TFA em água e (B) 100% acetonitrilo. O gradiente aplicado foi: 10% B até 3 min, 10 a 15% B 12 min, 15% B 5 min, 15 a 18% B 5 min, 18 a 30% B 20 min e 30 a 35% B 5 min, a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. Os solventes utilizados foram 0,1% ácido trifluoroacético (ATF) em água (A) e acetonitrilo (B). A eluição em modo gradiente seguiu os seguintes parâmetros: 10% B por 3 min, de 10 a 15% B por 12 min, 15% B por 5 min, de 15 a 18% B por 10 min, de 18 a 30% B por 20 min, de 30 a 35% B por 5 min e 35 a 10% B por 10 min. O tempo total de análise foi de 60 minutos, seguido do acondicionamento da coluna durante 10 min, a um caudal de 0,5 mL/min. A deteção foi realizada com um detetor DAD, utilizando como o comprimento de onda principal 520 nm, e com espectroscopia de massa ligada em série através da saída da célula DAD.

A deteção SM foi realizada em modo positivo utilizando um espectrómetro de massa Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan) equipado com uma fonte ESI. O azoto foi utilizado como gás de revestimento (50 psi); e o sistema foi operado com uma tensão de pulverização de 4,8 kV, uma temperatura da fonte de 320°C e uma tensão capilar de 14

V. O deslocamento da lente do tubo foi mantido a uma tensão de 75 V. O varrimento abrangeu uma amplitude de massa de  $m/z$  100 a 1500. A energia de colisão utilizada foi de 20 (unidades arbitrárias). A aquisição de dados foi realizada com o sistema de dados Xcalibur® (Thermo Finnigan).

A caracterização das antocianinas presentes nas amostras foi obtida recorrendo ao seu espectro UV-Vis e de massa, sendo os seus tempos de retenção comparados com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obteve-se a curva de calibração por injeção de solução-padrão: cyanidin-3-*O*-glucoside ( $y = 134578x - 3E+06$ ;  $R^2 = 0.9986$ ). Os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

### **3.5. Avaliação das propriedades bioactivas das polpas e cascas de kiwi verde e kiwi vermelho**

#### **3.5.1. Atividade antioxidante**

##### **3.5.1.1. OXLHIA**

As amostras de sangue foram coletadas de ovelhas saudáveis e centrifugadas a 1000g (5min, 10 °C). As camadas de plasma foram descartadas e os eritrócitos foram primeiramente lavados uma vez com NaCl (150 mM) e três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) (Evans et al., 2013). O sedimento de eritrócitos foi ressuspensão em PBS a 2,8% (v/v). Utilizando uma microplaca de 48 poços, 200  $\mu$ L da solução de eritrócitos foram misturados com 400  $\mu$ L de solução de PBS (controlo), de amostras antioxidantes dissolvidas em PBS ou água (para hemólise completa). O Trolox foi usado como controlo positivo. Após pré-incubação a 37 °C por 10 min com agitação, AAPH (200  $\mu$ L, 160 mM em PBS) foi adicionado e a microplaca foi incubada nas mesmas condições. A densidade ótica foi então medida a 690 nm a cada 10 minutos (Takebayashi et al., 2012). A percentagem da população de eritrócitos que permaneceu intacta (P) foi calculada recorrendo à fórmula seguinte:

$$P (\%) = (S_t - CH_0 / S_0 - CH_0) \times 100$$

Onde,  $S_t$  e  $S_0$  correspondem à densidade ótica da amostra em  $t$  e 0 min, respetivamente, e  $CH_0$  é a densidade ótica da hemólise completa a 0 min.

Os resultados foram expressos como tempo de atraso da hemólise ( $\Delta t$ ), tendo sido calculado recorrendo à expressão seguinte:

$$\Delta t \text{ (min)} = Ht_{50} \text{ (amostra)} - Ht_{50} \text{ (controlo)}$$

Onde,  $Ht_{50}$  é o tempo hemolítico de 50% (min) obtido graficamente a partir da curva de hemólise de cada concentração de amostra.

Os valores de  $\Delta t$  foram correlacionados às diferentes concentrações da amostra (Takebayashi et al., 2012) e, a partir da correlação obtida, a concentração inibitória ( $IC_{50}$ , mg/mL) capaz de promover um atraso da  $\Delta t$  hemólise de 60 e 120 min foi calculado.

### 3.5.1.2. Inhibición de la peroxidación lipídica utilizando sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Utilizou-se tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*; com cerca de 150 Kg de peso), dissecado e homogeneizado em gelo com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) numa proporção 1:2 (w/v) e após centrifugação a 3000g durante 10 min. Incubou-se uma alíquota (0,1 mL) do sobrenadante com as diferentes concentrações dos extratos (0,2 ml),  $FeSO_4$  (10  $\mu M$ ; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 mL) a 37 °C durante 1 h. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% w/v; 0,5 mL), seguindo-se a adição do ácido tiobarbitúrico (TBA; 2%, w/v; 0,38 mL). A mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min. Após centrifugação a 3000g durante 10 min para remoção de proteínas, a intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA) -TBA do sobrenadante foi medida através da sua absorvância a 532 nm. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:  $[(A - B)/A] \times 100\%$ , onde A e B era a absorvância do controlo e da solução com o extrato, respetivamente (Barros et al., 2010).

A concentração de extrato correspondente a 50% de inibição da peroxidação lipídica ( $EC_{50}$ ) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extrato. Utilizou-se trolox como padrão.

### **3.5.2. Atividade antimicrobiana**

#### **3.5.2.1. Atividade antibacteriana**

Para avaliação da atividade antibacteriana seguiu-se a metodologia descrita anteriormente por Carocho et al. (2015). Utilizaram-se bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Enterobacter cloacae* (isolado clínico), e bactérias Gram-positivas: *Bacillus cereus* (isolado a partir de matrizes alimentares), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973). Estes microrganismos foram adquiridos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” da Universidade de Belgrado na Sérvia. As concentrações mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) foram determinadas usando o método de microdiluição.

As culturas de bactérias foram ajustadas através do espectrofotômetro ficando com uma concentração de  $1 \times 10^5$  UFC/mL, correspondendo a uma suspensão bacteriana determinada num espectrofotômetro a 625 nm. As diluições de inóculos foram cultivadas em meio sólido para verificar a ausência de contaminação e verificar a validade do inóculo. As diferentes diluições do extrato hidroetanólico foram pipetadas para os poços contendo 100  $\mu$ L de caldo de soja tríptico (TSB) e, posteriormente, foram adicionados 10  $\mu$ L de inóculo. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

Para a determinação das CMIs (concentração mínima inibitória; menor concentração que produziu uma inibição significativa (em torno de 50%) do crescimento da bactéria em comparação com o controle positivo) foram adicionados 40  $\mu$ L de cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) (0,2 mg/mL) e incubou-se a 37 °C durante 30 min. As CMIs obtidas do teste de suscetibilidade de várias bactérias ao extrato foram determinadas também por um ensaio colorimétrico de viabilidade microbiana baseado na redução da cor INT e comparado com um controle positivo para cada estirpe bacteriana. A CMB (concentração mínima bactericida) foi determinada por subcultura em série, colocando 10  $\mu$ L de cada poço que não apresentou mudança de cor a 100  $\mu$ L de TSB. A menor concentração que não apresentou crescimento após essa subcultura foi considerada como a CMB. A estreptomicina e a ampicilina foram usadas como controles positivos, enquanto 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como controle negativo. Os resultados de CMI e MBC foram expressos em mg por mL de extrato hidroetanólico liofilizado.

### 3.5.2.2. Atividade antifúngica

Para a avaliação da atividade antifúngica foi seguido o procedimento descrito anteriormente por Carochi et al. (2015). Para tal, foram utilizados os microfungos *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839). Estes organismos foram adquiridos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” na Universidade de Belgrado na Sérvia.

Os micromicetos foram mantidos em malte ágar (MA) e as culturas foram armazenadas a 4 °C e sub-cultivadas uma vez por mês. Os esporos fúngicos foram lavados da superfície das placas de ágar com solução salina estéril a 0,85 % contendo Tween 80 a 0,1 % (v/v). A suspensão de esporos foi ajustada com uma solução salina estéril para uma concentração de aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  num volume final de 100 µL por poço. Os inóculos foram armazenados a 4 °C. As diluições dos inóculos foram cultivadas em MA sólido para verificar a ausência de contaminação e a validade do inóculo. A determinação da MIC foi realizada pela técnica de diluição sucessivas em microplacas de 96 poços. A amostra foi adicionada ao meio de malte com o inóculo fúngico e as microplacas foram incubadas durante 72 horas a 28 °C. As concentrações mais baixas sem crescimento visível (usando um microscópio binocular) foram definidas como CMI. As concentrações mínimas fúngicidas (CMFs) foram determinadas por subcultura em série de 2 µL de cada poço que não apresentou mudança de cor, em microplacas contendo 100 µL de caldo de malte por poço e posterior incubadas durante 72h a 28 °C. A menor concentração sem crescimento visível foi definida como CMF, indicando 99,5% de morte do inóculo original. O DMSO a 5% foi utilizado como controlo negativo, enquanto o cetoconazol foi utilizado como controlo positivo. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em mg por mL de extrato hidroetanólico.

### 3.5.3. Avaliação da atividade citotóxica

O efeito dos extratos no crescimento de linhas celulares tumorais humanas foi avaliado através do ensaio da Sulfarodamina B (SRB), a fim de determinar a inibição do crescimento celular. Para tal foram utilizadas 4 linhas celulares tumorais: MCF-7

(carcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular).

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

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

A seguir a este período de incubação, as células aderentes foram fixadas adicionando ácido tricloroacético 10% frio (TCA, 100 µL) e deixadas a repousar durante 60 min a 4 °C. As placas foram depois lavadas com água desionizada e secas. A cada poço foram adicionados 100 µL da solução SRB (0.1% em 1% de ácido acético) e as placas foram deixadas a incubar à temperatura ambiente, por 30 min. A SRB em excesso foi removida lavando as placas com ácido acético 1% e foram deixadas a secar ao ar. Depois a SRB ligada foi solubilizada com 10 mM Tris (200 µL) e a absorvância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas (Biotek Elx800).

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

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

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

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

Posteriormente foi feita uma subcultura de células e estas foram colocadas em placas de 96 poços com a densidade de  $1.0 \times 10^4$  células/poço e cultivadas em meio DMEM com FBS 10%, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Abreu et al., 2011).

#### **3.5.4. Avaliação da atividade anti-inflamatória**

As células macrófagas RAW 264.7 de rato foram usadas para avaliar a atividade anti-inflamatória de acordo com o procedimento de Jabeur et al. (2016). Foram feitas cultura de células em meio DMEM, suplementado com 10% de soro bovino inativado por calor e L-glutamina, a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, em ar humidificado.

As células com crescimento ativo foram soltas com um raspador de células, a densidade experimental das células foi estabelecida a  $5 \times 10^5$  células/mL e a proporção de células mortas foi inferior a 1%, de acordo com o teste de exclusão de Azul de Trypan. Seguidamente, as células foram distribuídas numa placa de 96 poços (150000 células/poço) e deixadas a aderir à microplaca durante a noite.

Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos durante 1 hora, seguido de estimulações com lipopolisacáridos (LPS) (1 µg/mL) ao longo de 18 horas. Foram preparados controlos sem a adição de LPS de forma a observar se estes induziam alterações nos níveis basais de óxido nítrico (NO).

A presença de óxido nítrico foi determinada utilizando um Kit de Reagentes Griess (Promega) que contem sulfanilamida, hidrócloro de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) e soluções nitradas. O sobrenadante das células (100 µL) foi transferido para a placa e misturado com sulfanilamida e solução NED, 5 a 10 minutos cada, à temperatura ambiente. O óxido nítrico produzido foi determinado medindo a absorvância a 540 nm (leitor de microplacas ELX800 Biotek) e comparado com a curva de calibração (Jabeur et al., 2016).

#### **3.6. Análise estatística**

Os ensaios descritos foram realizados em triplicado e os resultados foram expressos no formato  $\text{media} \pm \text{desvio padrão (SD)}$ . Os dados foram analisados através do teste

ANOVA, com o intuito de determinar as diferenças significativas entre as amostras, com  $p$ -value = 0.05 (SPSS v. 23.0; IBM Corp., Armonk, Nova Iorque, EUA).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da composição nutricional dos frutos de *Actinidia deliciosa* cv "Hayward" (kiwi de polpa verde) e *Actinidia* spp. (kiwi de polpa vermelha) estão representados na **Tabela 11**. Em ambas as variedades de kiwi, a água destacou-se como o principal componente, representando uma percentagem superior a 80% da composição total. A polpa de *A. deliciosa* cv "Hayward" apresentou menor teor de proteínas, cinzas e hidratos de carbono em comparação com a *Actinidia* spp., que contrariamente revelou um menor valor de gordura. Desta forma, a polpa de *Actinidia* spp., também apresentou o maior valor energético. Um estudo desenvolvido por López-Sobaler, Vizuet & Anta (2016), com o objetivo de caracterizar duas variedades de kiwis (*A. deliciosa* e *A. chinensis*), apresentaram valores energéticos similares (61 e 63 kcal, respectivamente) aos apresentados no presente trabalho. Da mesma forma também foram apresentados valores elevados de humidade e valores baixos de proteínas. A variedade Hayward também foi caracterizada como tendo o menor teor de proteína quando comparada à variedade Hort16A, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. Além disso, D'Evoli et al. (2015) analisaram diferentes genótipos de *A. chinensis*, mostrando teores de proteína mais elevados quando comparados com *A. deliciosa*. Esses dados também estão de acordo com os resultados apresentados no nosso estudo. Outro estudo revelou que em algumas variedades, as condições de cultivo também podem afetar o teor de proteínas, nomeadamente, Hayward cultivada na Nova Zelândia apresentou maior conteúdo em comparação à mesma variedade cultivada na China, no entanto, a variedade Hort16A de diferentes regiões não apresentou diferenças significativas (Ma et al., 2017).

Atualmente, os kiwis são caracterizados como superfrutos, devido ao seu baixo valor calórico e à elevada quantidade de água, fibra, vitamina C, entre outros nutrientes, que confirmam a qualidade da composição nutricional destes frutos recomendados para a população em geral (Latocha et al., 2010). O fato de conter valores calóricos muito baixos, faz com que essa fruta seja habitualmente inserida nos planos de dieta de controlo de peso.

**Tabela 11.** Composição nutricional (g/100 g de peso fresco), valor energético (kcal/100 g de peso fresco), composição em açúcares livres (g/100 g de peso fresco) e ácidos gordos (percentagem relativa) da polpa de kiwi verde (PuKG) e polpa de kiwi vermelho (PuKR).

	<b>PuKG</b>	<b>PuKR</b>	<b>p-valor</b>
Humidade	83,8 ± 0,1	82,3 ± 0,3	0,003
Lípidos	0,424 ± 0,001	0,031 ± 0,001	<0,0001
Proteínas	1,20 ± 0,07	1,54 ± 0,04	0,117
Cinzas	0,69 ± 0,04	0,78 ± 0,01	<0,0001
Hidratos de Carbono	13,9 ± 0,1	15,4 ± 0,4	0,015
Energia	64,2 ± 0,5	67,4 ± 0,6	0,017
<b>Açúcares</b>			
Frutose	3,83 ± 0,05	3,39 ± 0,03	0,818
Glucose	3,52 ± 0,09	3,09 ± 0,06	0,492
Sacarose	1,44 ± 0,01	3,94 ± 0,06	<0,0001
Trealose	0,110 ± 0,004	0,080 ± 0,003	0,005
Total em açúcares livres	8,9 ± 0,1	10,49 ± 0,03	<0,0001
<b>Ácidos gordos</b>			
C6:0	0,008±0,001	0,03±0,01	<0,0001
C8:0	0,016±0,001	0,04±0,01	<0,0001
C10:0	0,003±0,001	0,03±0,001	0,188
C11:0	0,024±0,003	0,099±0,001	<0,0001
C12:0	0,025±0,001	0,38±0,04	<0,0001
C13:0	0,018±0,004	0,017±0,001	0,093
C14:0	0,044±0,001	0,8±0,1	<0,0001
C15:0	0,015±0,001	0,165±0,004	<0,0001
C16:0	4,6 ± 0,1	14,3 ± 0,4	<0,0001
C16:1	0,106±0,008	1,05±0,04	<0,0001
C17:0	0,048±0,001	0,23±0,01	<0,0001
C17:1	0,020±0,001	0,10±0,01	<0,0001
C18:0	2,05 ± 0,02	2,9 ± 0,2	0,005
C18:1n9	9,7 ± 0,2	8,90 ± 0,03	0,151

	<b>PuKG</b>	<b>PuKR</b>	<b>p-valor</b>
C18:2n6	14,44 ± 0,08	28,3 ± 0,5	<0,0001
C18:3n6	0,024±0,002	0,012 ± 0,004	<0,0001
C18:3n3	68,0 ± 0,1	35,0 ± 0,2	<0,0001
C20:0	0,037±0,001	0,44 ± 0,01	<0,0001
C20:1	0,015±0,001	0,205 ± 0,004	<0,0001
C20:2	0,254±0,001	1,59 ± 0,04	<0,0001
C21:0	0,011±0,001	0,113 ± 0,001	<0,0001
C20:4n6	0,334 ± 0,002	4,71 ± 0,04	<0,0001
C22:0	0,043±0,003	0,27 ± 0,02	<0,0001
C22:1	0,081±0,001	0,04 ± 0,02	<0,0001
<b>SFA</b>	6,95± 0,09	19,77 ± 0,82	<0,0001
<b>MUFA</b>	9,9 ± 0,1	10,29 ± 0,08	0,002
<b>PUFA</b>	83,13 ± 0,04	69,9 ± 0,7	<0,0001

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. Ácido capróico (C6:0); Ácido caprílico (C8:0); Ácido cáprico (C10:0); Ácido undecílico (C11:0); Ácido Laurico (C12:0); Ácido tridecílico (C13:0); Ácido mirístico (C14:0); Ácido pentadecílico (C15:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido palmitoleico (C16:1); Ácido Margarico (C17:0); Ácido cis-10-heptadecenóico (C17:1); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9); Ácido linoleico (C18:2n6); Ácido  $\gamma$ -linoleico (C18:3n6); Ácido linolenico (C18:3n3); Ácido araquídico (C20:0); Ácido eicosenóico (C20:1); Ácido eicosadienóico (C20:2); Ácido Heneicosílico (C21:0); Ácido araquidônico (C20:4n6); Ácido Beénico (C22:0); Ácido erúico (C22:1); SFA- Ácidos gordos saturados; MUFA- Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA- Ácidos gordos polinsaturados.

Frutose, glucose, sacarose e trealose foram os açúcares livres encontrados em ambas as variedades de polpa (**Tabela 11**). A glucose, frutose e sacarose são os principais açúcares normalmente detetados nos frutos de *Actinidia* (Nishiyama, Fukuda, Shimohashi & Oota, 2008), o que vai de encontro aos resultados apresentados neste estudo. A literatura descreve que o teor de açúcares tende a aumentar com a maturação dos frutos, desta forma, na mesma variedade, os conteúdos podem sofrer algumas diferenças (Latocha, 2017). Neste estudo, a polpa de kiwi vermelho é caracterizada por ser uma das variedades com maior sabor adocicado, o que poderá estar relacionado com a maior quantidade de sacarose comparativamente ao kiwi de polpa verde. Nishiyama et al. (2008), verificaram que a variedade também influencia diretamente o teor total de açúcar uma vez que, a variedade “Hayward” apresentou teor de açúcar total significativamente menor que “Abbott” e “Koryoku”, mas significativamente maior que “Elmwood”. Por sua vez, *A. arguta* apresentou a sacarose como o açúcar principal seguido-se glucose e frutose (Cui et al., 2013; Latocha, 2017). Os resultados apresentados no presente estudo estão de acordo com os apresentados na literatura, que destacam a glucose e a frutose como os principais açúcares livres para as duas variedades analisadas.

A composição individual de ácidos gordos bem como o conteúdo de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados estão apresentados na **Tabela 11**. A polpa de ambas as variedades de kiwi estudadas, consiste principalmente em ácidos gordos insaturados, devido ao elevado contributo dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico. Estes resultados estão de acordo com dados relatados na literatura, que revela um perfil de ácidos gordos muito semelhante nas diferentes variedades de kiwi e, onde os ácidos gordos insaturados predominam numa quantidade definida de 70 a 85%, e se destaca o ácido palmítico e  $\alpha$ -linoleico como os principais ácidos gordos saturados e insaturados, respetivamente (Jin et al., 2014; Latocha, 2017). No entanto, apesar de ambas as variedades apresentarem na sua composição o mesmo perfil de ácidos gordos verificou-se tal como registado na **Tabela 11**, diferenças relativas aos compostos individuais que se traduzem na composição total. Por exemplo, verificou-se que as quantidades de ácidos gordos saturados estão numa quantidade muito mais elevada na polpa de kiwi vermelho, comparativamente com a polpa de kiwi verde. Um dos contribuintes para tal diferença foi o ácido palmítico que surgiu na polpa de kiwi vermelho numa percentagem ( $14,3 \pm 0,4$ ) três vezes superior ao apresentado na polpa de kiwi verde (4,6

$\pm 0,1$ ). Contrariamente, os ácidos gordos polinsaturados prevalecem na polpa de kiwi verde. Olhando individualmente para os compostos pode-se destacar as diferenças nos ácidos linoleico e linolenico que surgem na polpa de kiwi verde no dobro da percentagem relativamente à polpa de kiwi vermelho. Estas diferenças são previsivelmente confirmadas pela literatura que, destaca as variedades e condições de cultivo como capazes de provocar alterações significativas na composição química (Latocha, 2017).

A **Tabela 12** apresenta a composição em tocoferóis e ácidos orgânicos nas diferentes variedades e partes de kiwi (polpa e casca). O  $\alpha$ -tocoferol foi o vitâmero mais abundante em ambas as partes estudadas (polpa e casca) de ambas as variedades. Além disso, verificou-se que as polpas apresentaram apenas duas isoformas ( $\alpha$  e  $\gamma$ -tocoferol), enquanto as cascas revelaram três isoformas ( $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol) na sua composição. A polpa e casca de kiwi vermelho apresentaram o maior conteúdo de tocoferóis. Um estudo desenvolvido por Chun et al. (2006), que pretendeu comparar o teor de tocoferóis entre diferentes frutos e vegetais, revelou a presença de duas isoformas ( $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol) em kiwis. Além disso, os autores mencionaram que os kiwis apresentaram uma maior percentagem de tocoferóis em comparação com outros frutos, tais como uvas e ameixas. A literatura associa o consumo regular de vitamina E dos frutos e legumes, a atividade antioxidante capaz de garantir a redução do risco de doenças crônicas (Kim et al., 2011). Tendo em conta a quantidade elevada de vitamina E nas cascas de kiwi, estas poderiam ser positivamente exploradas pela indústria alimentar como ingrediente natural com propriedades funcionalizantes, capazes de atuar a nível da saúde dos consumidores.

Foram identificados quatro ácidos orgânicos (ácidos quínico, málico, cítrico e ascórbico) em todas as amostras analisadas (**Tabela 12**), sendo que a presença destes quatro ácidos orgânicos em frutos de kiwi já está relatada na literatura (Nishiyama et al., 2008). O ácido quínico foi o principal ácido orgânico identificado em todas as amostras, com exceção da polpa de "Hayward", que apresentou o ácido cítrico como principal composto. Também para *A. arguta* foi identificado um maior teor de ácido cítrico quando comparado com o ácido quínico. As diferenças obtidas entre as diferentes variedades podem ser associadas às condições de cultivo, como fertilidade do solo, condições climáticas e condições de crescimento das plantas, mas também devido a diferentes metodologias e condições de extração (ex: tempo, temperatura e solvente)

(Park et al., 2015; Latocha, 2017). Os kiwis são reconhecidos na literatura como frutos excepcionalmente ricos em ácido ascórbico (vitamina C) sendo que as quantidades podem variar consideravelmente entre diferentes variedades (Nishiyama et al., 2008). O facto de a vitamina C estar descrita como sendo relativamente instável e, portanto, facilmente oxidada na presença de oxigênio é uma das justificações para as variações que podem surgir entre variedades e/ou estudos (Okamoto & Goto, 2005) e que, podem justificar as variações significativas entre as polpas analisadas no presente estudo. No entanto as concentrações encontradas nas duas variedades vão ao encontro ao que está descrito para kiwi.

Marsh et al. (2003) realizaram estudos sensoriais com polpas de kiwi que revelaram, que os ácidos cítrico, quínico e málico podem causar diferentes perceções de acidez. Por exemplo, considera-se que o ácido quínico tem um impacto maior na perceção da acidez do que o ácido cítrico ou málico, sendo responsável pelo sabor característico da variedade “Hayward”. Da mesma forma, os frutos de *A. arguta* apresentam baixo teor de ácido quínico, o que pode justificar o fato de serem caracterizados como a variedade mais doce (Nishiyama et al., 2008). Portanto, os açúcares e os ácidos orgânicos são considerados os principais responsáveis pela determinação do sabor dos frutos, sendo também relatado que os ácidos orgânicos promovem o decaimento bacteriano dos frutos (Latocha, 2017).

**Tabela 12.** Tocoferóis (mg/100 g de peso fresco) e ácidos orgânicos (g/100 g de peso fresco) da polpa e casca de kiwi verde (PeKG e PuKG, respectivamente) e da polpa e casca de kiwi vermelho (PuKR e PeKR, respectivamente).

	<b>PuKG</b>	<b>PuKR</b>	<b>PeKG</b>	<b>PeKR</b>	<b>p-value</b>
<b>Tocoferóis</b>					
$\alpha$ -Tocoferol	1,7 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>	3,57 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	2,40 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	7,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	<0,0001
$\gamma$ - Tocoferol	0,040 $\pm$ 0,001 <sup>c</sup>	1,01 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,060 $\pm$ 0,002 <sup>c</sup>	1,70 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	<0,0001
$\delta$ - Tocoferol	n.d	n.d.	1,86 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	1,75 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	<0,0001
Tocoferóis totais	1,7 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	4,58 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	4,3 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	10,8 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	<0,0001
<b>Ácidos orgânicos</b>					
Ácido quinico	0,70 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	1,91 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	1,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	<0,0001
Ácido málico	0,58 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,60 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,82 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,62 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	<0,0001
Ácido cítrico	1,56 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	1,27 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	1,310 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup>	1,38 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	<0,0001
Ácido ascórbico	0,062 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup>	0,103 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,037 $\pm$ 0,002 <sup>d</sup>	0,0529 $\pm$ 0,0005 <sup>c</sup>	<0,0001
Total	2,90 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>	3,88 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	3,7 $\pm$ 0,1 <sup>ab</sup>	3,67 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	<0,0001

n.d.: não detectado. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey HSD e em cada coluna, diferentes letras significam diferenças significativas ( $p < 0,005$ ).

A composição fenólicas dos extratos hidroetanólicos da casca e polpa de ambas as variedades de *Actinidia* estão apresentados na **Tabela 13**. Foram detetados vinte compostos fenólicos não-antociânicos e uma antocianina, dos quais doze derivados de flavonoides e nove de ácidos fenólicos e derivados. Dos compostos identificados, treze foram identificados em cascas e dezasseis nas polpas.

Os compostos 10 e 17-20 foram identificados positivamente por comparação com padrões comerciais, sendo que todos eles surgem anteriormente descritos em kiwis (Sun-Waterhouse et al., 2009; Pinelli et al., 2013; Mena et al., 2016; Wojdyło et al. al., 2017). Os compostos remanescentes foram identificados como derivados glicosídicos do ácido cafeico (picos 1-6, 8, 9 e 16) e dímeros, trímeros, tetrâmeros e pentâmeros da (epi)catequina tipo-B (picos 7, 11-15), também previamente descritos em outros estudos de kiwi. Estes estudos foram levados em consideração para tentar identificar os compostos presentes neste estudo, comparando o padrão de fragmentação e os espectros de UV-Vis relatados anteriormente (Pinelli et al., 2013; Watson et al., 2014; Wojdyło et al. 2017, Commisso et al., 2019; Zhu et al., 2019; Sun-Waterhouse et al., 2009).

Li et al. (2018) estudou a composição fenólica da polpa verde de *A. deliciosa* cv. Hayward, sendo constituída maioritariamente por procianidina B1 e B2, ácido gálico, ácido clorogénico e quercetina-3-*O*-ramnosídeo, revelando uma composição muito semelhante à apresentada no nosso estudo. Flavan-3-ols parecem ser a principal classe de compostos fenólicos presentes em diversas variedades de kiwi reportados na literatura (Wojdyło et al., 2017), o que também está de acordo com os resultados apresentados nas variedades aqui estudadas. Além disso, a presença de taninos poliméricos de alto peso molecular, como taninos condensados, em kiwis tem sido apontada como correlação com a característica de adstringência da pele de kiwi (Kim, Beppu e Kataoka, 2009). No entanto, este tipo de compostos não foram detectados nas peles em estudo. Flavonóis, ácidos fenólicos e antocianinas também foram identificados nestes frutos por outros autores, sendo identificados em menor quantidade e geralmente seguindo a ordem mencionada (Wojdyło et al., 2017). Derivados de quercetina e kaempferol têm sido os principais flavonóis identificados nestes frutos (Latocha, 2017), enquanto os ácidos *p*-hidroxibenzóico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico e cafeico os principais ácidos fenólicos, e (+)-catequina, e (+)-epicatequina os principais flavan-3-ols (Kim, Beppu e Kataoka, 2009; Latocha et al., 2010).

**Tabela 13.** Composição em compostos fenólicos dos extratos de polpa e casca kiwi verde (PuKG e PeKG, respetivamente) e de extratos de polpa e casca de kiwi vermelho (PuKR e PeKR, respetivamente).

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\frac{[M-H]^-}{[M+H]^+}$ (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentativa de identificação	Referências	Quantificação (mg/g de extrato)			
							PuKG	PuKR	PeKG	PeKR
<b>Compostos não-antocianicos</b>										
1	4,33	318	503	341(100),179(72),135(7)	Dihexosídeo de ácido cafeico	Comisso et al., 2019	0,52±0,02	n.d.	n.d.	n.d.
2	4,69	310	323	179(100),135(9)	Derivados de ácido cafeico	Pinelli et al., 2013	0,38±0,01	n.d.	n.d.	n.d.
3	5,09	320	341	179(100),135(7)	Hexosídeo de ácido cafeico	Sun-Waterhouse et al., 2009	0,56±0,02	n.d.	n.d.	n.d.
4	5,29	320	297	179(37),135(100)	Derivados de ácido cafeico	Pinelli et al., 2013	n.d.	1,23±0,03c	8,6±0,2a	2,14±0,07b
5	5,38	322	341	179(100),135(15)	Hexosídeo de ácido cafeico	Sun-Waterhouse et al., 2009	tr	n.d.	n.d.	n.d.
6	6,46	320	341	179(100),135(22)	Hexosídeo de ácido cafeico	Sun-Waterhouse et al., 2009	0,65±0,03d	3,3±0,1b	13,60±0,03a	2,22±0,09c
7	7,51	281	577	451(27),425(100),407(32),289(10)	Dímero de (epi)catequina do tipo-B	Watson et al., 2014	n.d.	5,4±0,2c	35±1a	23,3±0,6b
8	7,63	321	341	179(100),135(8)	Hexosídeo de ácido cafeico	Sun-Waterhouse et al., 2009	1,69±0,04	n.d.	n.d.	n.d.
9	8,25	330	369	207(100),191(12)	Hexosídeo do ácido dimetil cafeico	Wojdylo et al., 2017; Pinelli et al., 2013	0,35±0,01c	n.d.	1,35±0,04a	0,85±0,01b
10	8,54	280	289	245(100),205(41),179(17)	Epicatequina	Wojdylo et al., 2017	11,8±0,6c	0,59±0,02d	163±4a	110±2b
11	10,65	281	865	739(87),713(52),695(100),577(72),425(18),289(3),287(12)	Trímero de (epi)catequina do tipo-B	Watson et al., 2014	n.d.	4,5±0,2c	24,6±0,7a	17,6±0,5b
12	11,78	281	1153	865(100),863(82),577(34),575(57),289(3),287(3)	Tetrâmero de (epi)catequina do tipo-B	Watson et al., 2014	n.d.	3,6±0,2c	30,4±0,5a	18,8±0,9b
13	12,71	281	865	739(76),713(59),695(100),577(66),425(15),289(5),287(9)	Trímero de (epi)catequina do tipo-B	Watson et al., 2014	n.d.	n.d.	14,9±0,7*	7,4±0,2*
14	13,26	281	1441	1153(20),865(34),863(47),577(38),289(9),287(29)	Pentâmero de (epi)catequina tipo-B	Watson et al., 2014	n.d.	n.d.	12,4±0,5*	7,7±0,3*
15	13,8	281	1441	1153(43),865(23),863(31),577(77),289(7),287(17)	Pentâmero de (epi)catequina tipo-B	Watson et al., 2014	n.d.	n.d.	12,9±0,6*	6,6±0,2*
16	14,53	320	411	369(5),207(100),191(27),179(5)	Hexosídeo de ácido acetil-dimetil cafeico	Sun-Waterhouse et al., 2009	n.d.	n.d.	3,33±0,04*	0,136±0,004*

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\frac{[M-H]^-}{[M+H]^+}$ (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentativa de identificação	Referências	Quantificação (mg/g de extrato)			
							PuKG	PuKR	PeKG	PeKR
17	17,64	351	609	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido	Wojdylo et al., 2017	0,358±0,003*	0,53±0,01*	n.d.	n.d.
18	18,76	352	463	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	Wojdylo et al., 2017	n.d.	0,64±0,01a	0,406±0,001b	0,42±0,01b
19	21,11	340	593	285(100)	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinósido	Mena et al., 2016	0,347±0,001	0,464±0,001	n.d.	n.d.
20	22,31	351	477	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnósido	Wojdylo et al., 2017	0,360±0,003c	2,59±0,05a	0,74±0,02b	0,295±0,002d
<b>Total de compostos não-antociânicos</b>							17±1d	23±1c	322±8a	197±3b
<b>Compostos antociânicos</b>										
21	16,81	516	581	287(100)	Cianidina-3- <i>O</i> -sambubiosido	Wojdylo et al. (2017)	n.d.	12,9±0,1	n.d.	n.d.

n.d.: não detectado; tr.: vestígios; Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão; curvas de calibração: ácido cafeico ( $y = 388345x + 406369$ ,  $R^2 = 0.9939$ ); catequina ( $y = 84950x - 23200$ ,  $R^2 = 1$ ); epicatequina ( $y = 10314x + 147331$ ,  $R^2 = 0.9994$ ); quercetina 3-*O*-glucosídeo ( $y = 34843x - 160173$ ,  $R^2 = 0.9988$ ) e cianidina-3-*O*-glucosídeo ( $y = 134578x - 3E+06$ ;  $R^2 = 0.9986$ ). Diferentes letras significam diferenças significativas ( $p < 0,005$ ). \*Significa diferenças estatísticas obtidas por um teste *t*-student.

A epicatequina (pico 10) foi o principal composto fenólico presente em todas as amostras, com exceção da polpa vermelha de kiwi, onde um dímero de (epi)catequina tipo-B (pico 7) se destacou como a principal molécula. As cascas da variedade “Hayward” apresentaram o maior conteúdo fenólico, enquanto entre as polpas o kiwi vermelho apresentou o maior conteúdo. Soquetta et al. (2016) descreveram que a composição fenólica é distinta nas diferentes partes que constituem o kiwi e que, normalmente, as cascas apresentam maior conteúdo que a polpa, o que também está de acordo com o presente estudo. Além disso, Leontowicz et al. (2016) compararam diferentes variedades de kiwi e procedimentos de extração em relação à composição fenólica e, revelaram que os extratos aquosos apresentaram maior conteúdo que os extratos etanólicos.

As antocianinas são muito conhecidas pela sua atividade antioxidante, mas também devido à cor vermelha, azul ou roxa que conferem a muitos frutos. Um estudo desenvolvido por Wojdyło et al. (2017) pretendeu verificar as diferenças no teor de antocianinas entre diferentes variedades de *Actinidia*, descrevendo a presença de cianidina-3-*O*-sambubiosídeo como a principal antocianina tanto nas cascas como nas polpas. Estes resultados estão de acordo com nosso estudo, que também apresentou esta antocianina como a principal molécula na polpa do kiwi vermelho (**Tabela 13**).

A cor vermelha característica das polpas das variedades de kiwi vermelho (*Actinidia spp.*), é atribuída à presença de diferentes antocianinas, nomeadamente a delphinidina-3-*O*-(xilósil)galactósido, delphinidina-3-*O*-galactósido, cianidina-3-*O*-(xilósil)galactosídeo, cianidina-3-*O*-galactosídeo, cianidina-3-*O*-sambubiosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo (Wojdyło et al. 2017; Peng et al., 2019). O conteúdo em antocianinas pode aumentar devido ao estado de maturação dos frutos, mas também devido ao armazenamento prolongado e às baixas temperaturas (90 dias a 0 °C) (Li et al., 2017).

A atividade antioxidante foi avaliada por meio de dois ensaios *in vitro*: inibição da formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA). Os resultados estão apresentados na **Tabela 14** e exibidos como valores de EC<sub>50</sub> (valor que representa a concentração de amostra que fornece 50% de atividade antioxidante). Tendo em conta que quanto menor o valor de EC<sub>50</sub> maior a atividade antioxidante (Arbos, Freitas, Stertz e Dornas, 2010), o ensaio TBARS e OxHLIA demonstra que ambas as cascas apresentaram maior atividade antioxidante do que as polpas. Em ambos os ensaios a melhor atividade antioxidante

também foi expressa pela casca de kiwi verde seguida da casca de kiwi vermelha. De facto, ambas as cascas de kiwi revelaram a capacidade de retardação da hemólise por 60 e 120 min, apesar da maior concentração necessária para a casca de kiwi vermelha. Estes resultados podem estar relacionados com o facto de as cascas apresentarem na sua composição, tal como descrito anteriormente, uma quantidade maior de compostos fenólicos, podendo estes estar correlacionados com a bioatividade expressa nesta parte do kiwi.

Encontram-se descritos na literatura resultados da atividade antioxidante do fruto de kiwi, embora aplicando diferentes ensaios, nomeadamente atividade captadora de radicais de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidróxido), poder redutor e sistema de modelo linoleato de  $\beta$ -caroteno (Bernardes et al., 2011; Park et al., 2015). Fiorentino et al. (2009) desenvolveu um estudo comparativo onde foi descrito que a casca de kiwi *in natura* apresentou maior atividade antioxidante do que a polpa, revelando um potencial de aplicação e aproveitamento das cascas de kiwi. Muitas das diferenças observadas entre as amostras estudadas e os resultados apresentados na literatura, poderiam ser explicados pelo facto de serem de variedades distintas, e/ou também devido às diferentes metodologias da atividade antioxidante aplicados, mas também poderá estar relacionado com a tecnologias de extração e solventes aplicados nos mesmo métodos (Ayala-Zavala, Wang, Wang, & González -Aguilar, 2004).

**Tabela 14.** Atividade antioxidante baseada em células de extratos de polpa de kiwi verde (PuKG) e casca (PeKG) e de extratos de polpa de kiwi vermelho (PuKR) e de casca (PeKR) avaliados por ensaios de OxHLIA e TBARS.

	OxHLIA		TBARS
	60 min	120 min	
PuKG	291±6 <sup>b</sup>	n.a.	406±16 <sup>a</sup>
PuKR	545±37 <sup>a</sup>	n.a.	377±26 <sup>b</sup>
PeKG	183±14 <sup>d</sup>	414±8*	76±5 <sup>d</sup>
PeKR	252±20 <sup>c</sup>	1439±37*	129±2 <sup>c</sup>
<i>p</i> -valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Os resultados são apresentados como valores de EC<sub>50</sub> (µg/mL). n.a.: nenhuma atividade. Trolox (controlo positivo) valores de EC<sub>50</sub>: 19,6 µg / mL (OxHLIA 60 min), 41,1 µg/ mL (OxHLIA 120 min) e 23 µg/ mL (inibição de TBARS). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão e analisados por meio de análise unidirecional de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey HSD e em cada coluna, diferentes letras significam diferenças significativas (p <0,005). \*Significa diferenças estatísticas obtidas por um teste *t*-student.

O atividade dos diferentes extratos de kiwi no crescimento das quatro linhas celulares tumorais humanas (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2) foi determinado e os valores de GI<sub>50</sub> (concentrações que causam 50% da inibição do crescimento celular) estão apresentados na **Tabela 15**. Os resultados mostraram que apenas as cascas da variedade de kiwi verde apresentaram resultados positivos para todas as linhas testadas (GI<sub>50</sub> <400 µg/mL), sendo capazes de inibir o crescimento das linhas celulares de MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (cancro de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) de forma moderada, o que poderia ser correlacionado com a maior composição fenólica presente nessas amostras. Nenhum dos extratos demonstrou toxicidade contra as linhas celulares de PLP2 (GI<sub>50</sub> > 400 µg / mL).

Os kiwis têm sido utilizados na medicina tradicional desde os tempos ancestrais, devido aos vários efeitos benéficos para a saúde humana. Algumas terapias chinesas de onde estes frutos são originários, incluíram kiwis na terapia contra o cancro (Zhang et al., 2015). O efeito inibitório de diferentes extratos obtidos de *Actinidia* contra diferentes linhas celulares humanas de cancro, como HepG2, HT29, Hep3B e HeLa, já foi confirmado em vários estudos *in vitro*, demonstrando desta forma propriedades citotóxicas associadas a este fruto (Lim et al., 2016).

Em relação à atividade anti-inflamatória, assim como no efeito da citotoxicidade, apenas as cascas da variedade de kiwi verde apresentaram essa capacidade. Estes resultados também estão de acordo com outros estudos descritos na literatura, como o desenvolvido por An et al. (2016), que também confirmou o potencial anti-inflamatório *in vivo* dos extratos de kiwi.

**Tabela 15.** Citotoxicidade, hepatotoxicidade e atividade anti-inflamatória do extrato da polpa de kiwi verde (PuKG) e da casca (PeKG) e do extrato da polpa de kiwi vermelho (PuKR) e da casca (PeKR).

	Citotoxicidade (GI <sub>50</sub> , µg/mL)				Hepatotoxicidade (GI <sub>50</sub> , µg/mL)	Atividade anti-inflamatória (IC <sub>50</sub> , µg/mL)
	NCI H460	HeLa	MCF7	HepG2	PLP2	RAW 246.7
PuKG	>400	>400	>400	>400	>400	>400
PuKR	>400	>400	>400	>400	>400	>400
PeKG	300±16	246±7	223±8	166±7	>400	316±6
PeKR	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Ellipticine	1,0±0,1	1,91±0,06	0,91±0,04	1,1±0,2	3,2±0,7	-
Dexametasona	-	-	-	-	-	16±1

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. Os valores de GI<sub>50</sub> correspondem à concentração da amostra que atinge 50% de inibição do crescimento em linhas celulares tumorais humanas ou em cultura primária de fígado PLP2.

Além da ação antioxidante, citotoxicidade e anti-inflamatório, os frutos de kiwi também demonstraram ter uma excelente atividade antimicrobiana contra algumas bactérias patogênicas, nomeadamente, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Kichaoi, El-Hindi, Mosleh, & Elbashiti, 2015). Assim, era imperativo realizar um estudo antimicrobiano (atividade antibacteriana e antifúngica) de cascas e polpas das duas variedades estudadas, podendo desta forma confirmar este potencial. A **Tabela 16** apresenta os resultados em relação às atividades antibacteriana e antifúngica contra um painel de quatro bactérias (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) e quatro fungos (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium funiculosum*), selecionados de acordo com sua importância na saúde pública. A primeira parte da **Tabela 16** corresponde à atividade antibacteriana, onde se pode verificar que a polpa de kiwi verde apresentou os menores valores de MIC para *Bacillus cereus*, juntamente com a casca de kiwi vermelho para *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter cloacae*, enquanto que o menor valor de MIC para *Escherichia coli* foi verificado para a polpa kiwi vermelho. Na segunda parte da **Tabela 16**, são apresentados os resultados referentes à atividade antifúngica, onde existe uma grande similaridade entre os diferentes extratos testados. A casca de kiwi vermelho apresentou o menor valor de MIC para *Aspergillus ochraceus*, enquanto que a casca de kiwi verde revelou a menor MIC para *Penicillium funiculosum*.

**Tabela 16.** Atividade antimicrobiana do extrato da polpa de kiwi verde (PuKG) e da casca (PeKG) e do extrato da polpa de kiwi vermelho (PuKR) e da casca (PeKR).

Atividade antibacteriana (MIC e MBC expresso em mg/mL de extrato)								
	Bactérias Gram-positiva				Bactérias Gram-negativa			
	<i>Bacillus cereus</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
PuKG	3	4	2	4	2	4	2	4
PuKR	4	8	4	8	1	2	4	8
PeKG	4	8	4	8	2	4	4	8
PeKR	4	8	2	4	1.5	2	2	4
Estreptomicina	0,10	0,20	0,20	0,30	0,20	0,30	0,20	0,30
Ampicilina	0,25	0,40	0,40	0,50	0,40	0,50	0,25	0,50

Atividade antifúngica (MIC e MFC expresso em mg/mL de extrato)								
	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Aspergillus ochraceus</i>		<i>Aspergillus versicolor</i>		<i>Penicillium funiculosum</i>	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
PuKG	4	8	4	8	4	8	8	>8
PuKR	4	8	4	8	4	8	8	>8
PeKG	4	8	4	8	4	8	4	8
PeKR	4	8	2	4	4	8	4	8
Cetoconazol	0,20	0,50	0,15	0,20	0,20	0,50	0,20	0,50

MIC – Concentração inibitória mínima; MBC – Concentração bactericida mínima; MFC – Concentração fungicida mínima.

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que descrevem o excelente potencial antimicrobiano apresentado por *A. deliciosa* (Tiwari, Tiwari, Patel & Tiwari, 2017). Um estudo realizado por Fisher e Phillips (2008) estudou o potencial antimicrobiano do kiwi e destacou as bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) como sendo mais vulnerável ao óleo essencial obtido destes frutos do que as bactérias Gram-negativas (*E. coli*). Este fato foi justificado pela presença de uma membrana hidrofílica externa com moléculas lipopolissacarídicas em bactérias Gram-negativas, que atuam como barreira aos compostos hidrofóbicos. Além disso, recentemente, um estudo desenvolvido por Kichaoi et al. (2015) também revelou um bom potencial antimicrobiano de diferentes extratos de kiwi (etanol, metanol e água) contra *S. aureus* e *E. coli*. Assim, os resultados apresentados no presente estudo estão de acordo com os resultados anteriormente reportados na literatura.

## 5. Conclusão

Este trabalho confirmou a composição nutricional destes frutos, que os destaca como super-frutos, além de demonstrar o potencial das cascas que também apresentaram um rico conteúdo em compostos bioativos. Os resultados obtidos permitiram concluir que a água é o principal componente em ambas as variedades, sendo que a polpa de kiwi verde apresentou o menor teor de proteínas, cinzas e hidratos de carbono, comparativamente com a polpa de kiwi vermelha. No entanto, o conteúdo em lípidos foi relativamente mais baixo na variedade de kiwi de polpa vermelha. Relativamente à composição em açúcares, a glucose e a frutose destacaram-se como os principais açúcares livres para as duas variedades analisadas. Por sua vez, o ácido linoleico e  $\alpha$ -linolénico foram as moléculas maoritárias encontrados em ambas as variedades de kiwi estudadas, o que justifica o facto de os ácidos gordos insaturados prevalecerem relativamente aos ácidos gordos saturados nestes frutos. O  $\alpha$ -tocoferol foi o vitâmero mais abundante em todas as amostras analisadas, no entanto, verificou-se que as cascas apresentaram uma concentração muito superior comparativamente à polpa. Embora as polpas de kiwi tenham sido extensivamente estudadas nas últimas décadas, devido aos seus benefícios para a saúde, as cascas também têm atraído interesse principalmente pelo seu potencial valor comercial como ingredientes naturais promissores (devido à sua rica composição em moléculas bioativas), mas também devido à redução de resíduos agroindustriais.

Ambas as variedades de casca analisadas revelaram um perfil fenólico promissor, enfatizando o seu potencial bioativo, que poderia ser explorado em diferentes áreas industriais, particularmente pela indústria alimentar como ingrediente conservante natural. A caracterização fenólica revelou a presença de treze compostos fenólicos nas cascas e dezasseis compostos nas polpas. As cascas destacaram-se por apresentarem na sua composição uma quantidade muito superior, especialmente a casca de kiwi verde. Relativamente à presença de antocianinas, apenas a polpa de kiwi vermelho apresentou uma antocianina na sua composição que é a responsável pela sua coloração.

Relativamente às bioatividades, o estudo da atividade antioxidante realizado através de dois ensaios *in vitro* relevou que, ambas as cascas apresentaram maior atividade antioxidante comparativamente com as polpas. Já na atividade antitumoral verificou-se que a apenas a casca de kiwi verde apresentou capacidade de inibir o

crescimento das quatro linhas celulares tumorais estudadas. O facto de as cascas terem apresentado as maiores concentrações em compostos fenólicos relativamente às polpas, poderá justificar os melhores resultados obtidos neste estudo.

Assim, e uma vez que, existem muito poucos estudos sobre cascas de kiwi, este trabalho permitiu realizar uma caracterização completa, em termos de caracterização química e bioativa de duas variedades de kiwi (kiwis de polpa verde e vermelha), a fim de explorar o potencial de aplicação deste residuo que, normalmente é descartado com pouco valor.

Como prespectivas futuras, seria desejada a otimização da extração de compostos de interesse através da comparação de distintas técnicas e variáveis, tais como tempo, temperatura e solventes, de forma a garantir as condições ótimas que maximizam o rendimento e a pureza. A incorporação de um extrato obtido a partir da casca de kiwi num produto alimentar e a avaliação dos efeitos dessa mesma incorporação ao longo do tempo de prateleira, seria um desafio interessante e inovador que, poderia confirmar a aplicação deste tipo de extrato na indústria alimentar com enorme impacto a nível ambiental e económico

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Abreu, R.M.V., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Lima, R.T., Vasconcelos, M.H., Adegas, F., Chaves, R. & Queiroz, M.J.R.P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 5800-5806.

Amarante, J.O.A. Os segredos do vinho: para iniciantes e iniciados. São Paulo: Mescla, 2018.

An, X., Lee, S.G., Kang, H., Heo, H.J., Cho, Y.S., & Do, K. (2016). Antioxidant and anti-inflammatory effects of various cultivars of kiwi berry (*Actinidia arguta*) on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J Microbiol Biotechnol*, 26, 1367-1374.

Ana. Manual de conservação e reuso da água na agroindústria sucroenergética. Agência Nacional da Águas – FIESP – ÚNICA- CTC – Brasília, 2009. Disponível em: <[www.fiesp.com.br/ambiente/downloads/publicaguab.pdf](http://www.fiesp.com.br/ambiente/downloads/publicaguab.pdf)> Acesso em 13 abril de 2019.

Annunziata, A. & Vecchio, R. (2011). Functional foods development in the European market: A consumer perspective. *Journal of Functional Foods*, 3, 223-228.

Anvisa. Regulamentação de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia no Brasil. Portaria n. 540, 27 oct 1997.

AOAC. (2016). Official methods of analysis of AOAC International, 20th edition. Association of Official Analytical Chemists International; Arlington; USA.

Araújo, P.P.P. & Costa, L.P. Impactos ambientais nas atividades de abate de bovinos: um estudo no matadouro público municipal de Caicó-RN. Holos, 2014.

Arbos, K. A., Freitas, R. J. S. D., Stertz, S. C., & Dornas, M. F. (2010). Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(2), 501–506.

Arulkumar, A., Ramanchandran, K., Paramasivam, S., Palanivel, R. & Miranda, J. M. (2017). Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on shelf life extension and biogenic amine control of cuttlefish (*Sepia brevimana*) during chilled storage. *CyTA - Journal of Food*, 15, 441-447, DOI: 10.1080/19476337.2017.1296495

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. 2017. Aditivos alimentares mais relevantes no âmbito da segurança alimentar. Disponível em: <<https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/aditivos-alimentares/aditivos-alimentares-mais-relevantes.aspx>>. Acesso em: 07 de abril de 2019.

Aun, M., Mafra, C., Philippi, J., Kalil, J., Agondi, R., & Motta, A. (2011). Aditivos em alimentos. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, 5, 177–186.

AJAP-Associação dos Jovens Agricultores de Portugal (2017) Manual Boas Práticas para Culturas Emergentes: A Cultura do Kiwi. 1a edição, Pensar Global, pela Competitividade, Ambiente e Clima. Lisboa.

Ayala-Zavala, J. F., Wang, S. Y., Wang, C. Y., & González-Aguilar, G. A. (2004). Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *LWT-Food Science and Technology*, 37(7), 687–695.

Barreto, L.C.O. Microencapsulamento de compostos fenólicos extraídos de resíduo do processamento de caju (*Anacardium occidentale* L.). Rio de Janeiro, 2015. 143f.

Barros, L., Oliveira, S., Carvalho, A.M., & Ferreira, I.C.F.R. (2010). *In vitro* antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Industrial Crops and Products*, 32, 572–579.

Barros, L., Pereira, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2013a). Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid

Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Analytical Methods*, 6, 309–316.

Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R.C., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2013b). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5, 1732–1740.

Bernardes, N.R., Talma, S.V., Sampaio, S.H., Nunes, C.R., Almeida, J.A.R. & Oliveira, D.B. (2011). Atividade antioxidante e fenóis totais de frutas de campos dos Goytacazes RJ. *Ciência Biológicas e da Saúde*. v1, n.1.

Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. *Industrial Crops and Products*, 89, 45–51.

Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D. & Fito, P. (2011). Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science & Technology* 22, 498–508.

Bigliardi, B. & Galati, F. (2013). The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31, 118-129.

Borges, A.M. et al. (2010). Estabilidade da pré-mistura de bolo com 60% de farinha de banana verde. *Ciência e Agrotecnologia*, 34, 173-181.

Branen, A., Davidson, P., Salminen, S., & Thorngate, J. (2001). Food additives. New York: Taylor & Francis.

Bredesen, D. E. O fim do Alzheimer. Alfragide-Portugal: lua de papel, 2017.

Broinizi, P.R.B., Andrade-Wartha, E.R.S., Silva, A.M.O., Novoa, A.J.V., Torres, R.P., Azeredo, H.M.C., Alves, R.E., & Mancini-Filho, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciência e Tecnologia de alimentos*, Campinas, 2007.

Caetano, P. K., Vieites, R. L. & Daiuto, E. R. (2011). Caracterização físico-química e avaliação energética de geléia elaborada em diferentes tipos de tachos com polpa e suco de acerola. *Revista Energia na Agricultura*, 26(2), 103-118. DOI: 10.17224/EnergAgric.2011v26n2p103-118.

Caleja, C., Barros, L., Antonio, A.L., Ciric, A., Barreira, J.C.M., Soković, M., Oliveira, M.B.P.P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2015a). Development of a functional dairy food: exploring bioactive and preservation effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Journal of functional foods*, 16, 114–124.

Caleja, C., Barros, L., Antonio, A.L., Ciric, A., Soković, M., Oliveira, M.B.P.P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2015b). *Foeniculum vulgare* Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. *Journal of functional foods*, 12, 428–438.

Caleja, C., Barros, L., Antonio, A.L., Carocho, M, Oliveira, M.B., & Ferreira, I.C.F.R. (2016). Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. *Food Chemistry*, 210, 262–268.

Caleja, C., Barros, L., Antonio, A.L., Oliveira, M.B., & Ferreira, I.C.F.R. (2017a). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, 216, 342-346.

Caleja, C., Barros, L., Prieto, M.A., Barreiro, M.F., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R. (2017b). Extraction of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* L. by maceration, microwave and ultrasound extraction techniques: a comparative study through response surface analysis. *Separation and Purification Technology*, 186, 297–308.

Çam, M., İçyer, N.C. & Erdoğan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 117–123.

Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Esteve, M.J. & Frígola, A. (2014) Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of

Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 155-171.

Carocho M., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.

Carocho, M., Barreiro, M., Morales, P. & Ferreira, I.C.F.R. (2014). Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 377-399.

Carocho, M., Barros, L., Calhella, R.C., Ćirić, A., Soković, M., Santos-Buelga, C., Morales, P., & Ferreira, I.C.F.R. (2015). *Melissa officinalis* L. decoctions as functional beverages: a bioactive approach and chemical characterization. *Food & Function*, 6, 2240–2248.

Carocho, M., Barreira, J.C.M., Bento, A., Fernández-Ruiz, V., Morales, P., & Ferreira, I.C.F.R. (2016). Chestnut and lemon balmbased ingredients as natural preserving agents of the nutritional profile in matured “Serra da Estrela” cheese. *Food Chemistry*, 204, 185-194.

Carocho, M., & Ferreira, I.C.F.R. (2017). Food Additives: Classification, Regulation and Analysis. *Reference Module in Chemistry, Molecule Sciences and Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14310-0>

Carvalho, A. V. & Lima, L. C. O. (2002). Qualidade de kiwis minimamente processados e submetidos a tratamento com ácido ascórbico, ácido cítrico e cloreto de cálcio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37, 679-685. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2002000500013>.

Cass, Q. B., & Cassiano, N. Cromatografia Líquida: novas tendências e aplicações. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

Castañeda-Sánchez, A., & Guerrero-Beltrán. J.A. (2015). Pigmentos En Frutas Y Hortalizas Rojas: Antocianinas. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos*, 9, 25–33.

Chiu, K. L., Cheng, Y. C., Chen, J. H., Chang, C. J., & Yang, P. W. (2002). Supercritical fluids extraction of *Ginkgo ginkgolides* and flavonoids. *Journal of Supercritical Fluids*, 24, 77–87.

Chouchouli, V., Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Karvela, E., Makris, D. P. & Karathanos, V. T. (2013). Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 53, 522-529.

Chun, J., Lee, J., Ye, L., Exler, J., & Eitenmiller, R.R. (2006). Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 196–204.

Coelho, R. A. (2015). Obtenção de óleo de sementes de quiuí (*Actinidia deliciosa*) utilizando extração com solvente pressurizado e extração assistida com ultrassom. 75 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná.

Commisso, M., Negri, S., Bianconi, M., Gambini, S., Avesani, S., Ceoldo, S., Avesani, L. & Guzzo, F. (2019). Untargeted and Targeted Metabolomics and Tryptophan Decarboxylase *In Vivo* Characterization Provide Novel Insight on the Development of Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*). *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 897-920.

Cui M, Liang D, Wu S, Ma F, & Lei Y (2013) Isolation and developmental expression analysis of L-myo-inositol-1- phosphate in four *Actinidia* species. *Plant Physiol Biotechnol* 73, 351–358.

Covino, R., Monteiro, A. R. G., Scapim, M. R. S., & Marques, D. R. (2015). Manufacturing cereal bars with high nutritional value through experimental design. *Acta Scientiarum Technology*, 37 (1): 149-154. DOI: 10.4025/actascitechnol.v37i1.20732

Cortez, L. C. Estudo do potencial de utilização da biomassa resultante da poda de árvores urbanas para a geração de energia: Estudo de Caso: AES ELETROPAULO. São Paulo, 2010. 246p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Crozier, A., Del Rio, D. & Clifford, M.N. (2010) Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 446-467.

Cunha, A.L., Moura, K.S., Barbosa, J.C., & Santos, A.F. (2016). Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. *Diversitas Journal*, 1: 175.

Dai, J. & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.

D'Evoli, L., Moscatello, S., Lucarini, M., Aguzzi, A., Gabrielli, P., Proietti, S., et al. (2015). Nutritional traits and antioxidant capacity of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* Planch., cv. Hayward) grown in Italy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 25-29.

Dias, V. M., Dias, K. M. & Pilla, V. Desenvolvimento e análise sensorial de hamburger de soja enriquecido com linhaça e quinoa. XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

Dias, M.I., Caleja, C., Ferreira, I.C.F.R., & Barreiro, M.F. (2017). The use of encapsulation to guarantee the stability of phenolic compounds. Chapter 6. In *New Polymers for Encapsulation of Nutraceutical Compounds*. Wiley-Blackwell. Ed: Jorge Carlos Ruiz Ruiz and Maira Rubi Segura Campos. ISBN: 978-1-119-22879-0.

Dias, M.I., Ferreira I.C.F.R. & Barreiro M.F. (2015). Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food & Function*, DOI: 10.1039/c4fo01175a.

Dixit, S., Mishra, K.K., Khanna, S.K., & Das, M. (2008). Benzoate and synthetic color risk assessment of fast food sauces served at street food joints of lucknow. India. *Am. J. Food Technol.*, 3, 183-191.

Du, G., Li, M., Ma, F. & Liang, D. (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry*, 113, 557-562, 2009.

Evans, B.C., Nelson, C.E., Yu, S.S., Beavers, K.R., Kim, A.J., Li, H., Nelson, H.M., Giorgio, T.D. & Duvall, C.L. (2013). *Ex vivo* red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J. Vis. Exp.* e50166.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2019.

Farhat, A., Fabiano-Tixier, A-S., Maataoui, M. E., Maingonnat, J-F., M. & Chemat, F. (2011). Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food and bioproducts processing*, 125, 255-261.

Farinha, P. M. D. Efeito da liofilização e da adição de goma arábica no potencial bioativo de extratos de morango e kiwi. Relatório (Mestrado) - Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco. 2014. 86 f.

Fasolini, L.H. et al. (2007). Biscoitos produzidos com farinha de banana verde: avaliações química, física e sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 524-529.

Ferguson, A.R. (2015) “Kiwifruit in the World - 2014”. *Acta Horticulturae*. 1096, 33-46 DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1096.1

Ferreira, A. L. D. (2015). Culturas energéticas: produção de biomassas e bioenergia. Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade de Coimbra. 74 p.

Fisher K, & Phillips C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends Food Sci Technol*, 19(3), 156–164.

Fiorentino, A., Mastellone, C., D’Abrosca, B., Pacifico, S., Scognamiglio, M., Cefarelli, G., Caputo, R. & Monaco, P. (2009).  $\delta$ -Tocomonoenol: A new vitamin E from kiwi (*Actinidia chinensis*) fruits. *Food Chemistry*, 115(1), 187–92.

Fontes, O.L. Farmácia homeopática: teoria e prática. Tamboré, Manole, 2013.

Franco, J. & Antunes, M. D. (Ed.), Kiwi-Da produção à comercialização (pp. 20-23). Algarve: Universidade do Algarve. 2008.

Garcia, C. M. S. Microencapsulação por Spray Drying de Compostos Bioativos de Subprodutos do Ananás. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar, Universidade de Lisboa, 2016.

Garzón, G.A. (2008). Las Antocianinas Como Colorantes Naturales Y Compuestos Bioactivos: Revisión. *Acta Biol. Colomb.*, 13(3), 27–36.

Gava, A.J., Silva, A.B., & Farias, J.R.G. Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações. São Paulo: Nobel, 2008.

Giordano, G. Tratamento e controle de efluentes industriais. Departamento de engenharia sanitária e do meio ambiente: UERJ, 2004. 81p.

Gonçalves, B. C. Eliminação/Valorização de Resíduos de Frutas (kiwi) por Digestão Anaeróbia. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia Ambiental. 2016. 80 f.

Gonçalves, G. A., Soares, A. A., Correa, R. C. G., Barros, L., Haminiuk, C. W. I., Peralta, R. M., & Bracht, A. (2017). Merlot grape pomace hydroalcoholic extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Journal of Functional Foods*, 33, 408–418.

Gondim, J. A. M., Moura, M. D. F. V., Dantas, A. S., Medeiros R. L. S. & Santos, K. M. (2005). Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25 (4), 825 – 827.

Ibero Massa Florestal. (2014). Estudo de quantificação do total de resíduos agrícolas e vegetais em cada distrito principalmente centro/norte, de cada biomassa proveniente de podas. Disponível em: <<http://www.imflorestal.com/wp-content/uploads/2016/01/2.1.-Estudo-de-quantificac%CC%A7a%CC%83o-dos-resi%CC%81duos-agri%CC%81colas.pdf>>. Acesso em: 23 abri. 2019.

ICA - Intercâmbio comercial do agronegócio: principais mercados de destino. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio, 2012. 456 p. il.

Iensen, D., Santos, I. V., Quast, E. & Raupp, D. S. (2013). Desenvolvimento de geleia de kiwi: influencia da polpa, pectina e brix na consistência. UNOPAR científica. *Ciências biológicas e da saúde*, 15, 369-376.

INE, Instituto Português de Estatísticas Agrícolas 2017. Lisboa – Portugal, 2018.

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Tabela da Composição de Alimentos. Lisboa: Centro de Segurança Alimentar e Nutrição Depósito legal, p. 21-118, 2006.

Iwasawa, H., Morita, E., Yui, S. & Yamazaki, M. (2011). Anti-oxidant effects of kiwi fruit *in vitro* and *in vivo*. *Biol Pharm Bull.* 34, 128–34. DOI: 10.1248 / bpb.34.128

Jabeur, I., Tobaldini, F., Martins, N., Barros, L., Martins, I., Calhelha, R. C., Henriques, M., Silva, S., Achour, L., Santos-Buelga, C. & Ferreira, I.C.F.R. (2016). Bioactive properties and functional constituents of *Hypericum androsaemum* L.: A focus on the phenolic profile. *Food Research International*, 89, 422-431.

Jayachandra, C., Venugopal, K. A. & Appaiah, A. Utilization of phytotoxic agro waste coffee cherry husk through pretreatment by the ascomycetes fungi *Mycotypha* for biomethanation. *Energy for sustainable development.* 2011. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2011.01.001>.

Jeronimo, C.E.M. (2012). Gestão Agroindustrial: Pontos Críticos de Controle Ambiental no Beneficiamento de Frutas. *Revista de Administração de Roraima*, 12, 70-77. DOI: 10.18227/rarr.v2i2.1139.

Jin DE, Park SK, Park CH, Seung TW, & Ho J (2014) Nutritional compositions of three traditional Actinidia (*Actinidia arguta*) cultivars improved in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43(12):1942– 1947.

Juarez-Garcia, E. et al. (2006). Composition, digestibility and application in bread making of banana flour. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 131-137.

Karakaya, S. (2004). Bioavailability of Phenolic Compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 453-464.

Kichaoui, A.E., El-Hindi, M., Mosleh, F., & Elbashiti, T.A. (2015). The antimicrobial effects of the fruit extracts of *Punica granatum*, *Actinidia deliciosa* and *Citrus maxima* on some human pathogenic microorganisms. *Am Int J Biol*, 3, 63-75.

Kim, J. G., Beppu, K., & Kataoka, I. (2009). Varietal differences in phenolic content and astringency in skin and flesh of hardy kiwifruit resources in Japan. *Scientia Horticulturae*, *120*, 551–554.

Kim, H. G., Kim, G. S., Park, S., Lee, J. H., Seo, O. N., Lee, S. J., & Shin, S. C. (2011). Flavonoid profiling in three citrus varieties native to the Republic of Korea using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry: Contribution to overall antioxidant activity. *Biomedical Chromatography*, *26*(4), 464–470.

Kumar, V. et al. (2013). Quality and storability of chicken nuggets formulated with Green and soybean hulls flours. *Journal Food Science Technology*, *50*, 123-134.

Latocha, P. (2017). The Nutritional and Health Benefits of Kiwiberry (*Actinidia arguta*) – a Review. *Plant Foods Hum Nutr*, *72*:325–334

Latocha, P., Krupa, T., Wołosiak, R., Worobiej, E. & Wilczak, J. (2010). Antioxidant activity and chemical difference in fruit of different *Actinidia* sp. *Int. J. Food Sci. Nutr.* *61* (4), 381–394.

Lelis, M. G. Aproveitamento integral dos alimentos: Saiba como aproveitar melhor os alimentos reduzindo o seu desperdício. Viçosa-MG: AS Sistemas, 2015.

Leonel, M., Martins, J. C. & Mischán, M. M. Produção de snacks funcionais à base de farinha de soja e polvilho azedo. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.40, n.6, p.1418-1423, jun, 2010. DOI: 10.1590/S0103-84782010005000092

Leontowicz, H., Leontowicz, M., Latocha, P., Jesion, I., Park, Y.-S., Katrich, E., Barasch, D., Nemirovski, A. & Gorinstein, S. (2016). Bioactivity and nutritional properties of hardy kiwi fruit *Actinidia arguta* in comparison with *Actinidia deliciosa* ‘Hayward’ and *Actinidia eriantha* ‘Bidan’. *Food Chemistry*, *196*, 281–291.

Li, Z., Jiang, H., Xu, C., & Gu, L. (2015). A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. *Food Hydrocolloids*, *43*, 153-164.

Li, H.-Y., Yuan, Q., Yang, Y.-L., Han, Q.-H., He, J.-L., Zhao, L., Zhang, Q., Liu, S.-X., Lin, D.-R., Wu, D.-T., & Qin, W. (2018). Phenolic Profiles, Antioxidant

Capacities, and Inhibitory Effects on Digestive Enzymes of Different Kiwifruits. *Molecules*, 23, 2957. <https://doi.org/10.3390/molecules23112957>.

Lim, S., Han, S.H., Kim, J., Lee, H.J., Lee, J.G., & Lee, E.J. (2016). Inhibition of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta*) ripening by 1- methylcyclopropene during cold storage and anticancer properties of the fruit extract. *Food Chem*, 190, 150–157.

Lopez, C.J., Caleja C., Prieto, M.A., Sokovic, M., Calhelha, R.C., Barros, L., & Ferreira, I. C.F.R. (2019). Stability of a cyanidin-3-*O*-glucose extract obtained from *Arbutus unedo* L. and incorporation into wafers for colouring purposes. *Food Chemistry*. 275, 426-438.

López-Sobaler, A.M, Vizquete, A.A, & R Anta, R.M.O. (2016). Nutritional and health benefits associated with kiwifruit consumption. *Nutrición Hospitalaria*, 33 (Supl. 4), 21-25. ISSN 0212-1611.

Lousada Junior, J. E., Costa, J. M. C., Neiva, J. N. M. & Rodriguez, N. M. (2006). Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. *Revista Ciência Agronômica*, 37, 70-76.

Lu, F.C., & Kacew, S. *Lu's Basic Toxicology: Fundamentals, target organs and risk assessment*. London: Taylor & Francis, 2002.

Luque de Castro, M.D., & Priego-Capote F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2383–2389.

Ma, T., Sun, X., Zhao, J., You, Y., Lei, Y., Gao, G. & Zhan, J. (2017). Nutrient compositions and antioxidant capacity of kiwifruit (*Actinidia*) and their relationship with flesh color and commercial value. *Food Chemistry*, 218, 294-304.

Machado, W. M., Pereira, A. D. & Marcon, M. V. (2013). Efeito do processamento e armazenamento em compostos fenólicos presentes em frutas e hortaliças. *Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.*, 19, 17-30. DOI: 10.5212/Publ.Exatas.v.19i1.0002

Martins, A., Barros, L., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I.P., Barreiro, F. & Ferreira, I.C.F.R. (2014). Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food & Function*, 5, 1091-1100.

Martins, C.R., Lopes, W.A., & Andrade, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. Química Nova vol. 36, n.8, São Paulo, 2013.

Matos, A. T., & Lo Monaco, P. A. Tratamento e aproveitamento agrícola de resíduos sólidos e líquidos da lavagem e despolpa de frutos do cafeeiro. Viçosa: UFV; Associação dos Engenheiros Agrícolas de Minas Gerais, 2003. 68 p. (Boletim técnico).

Melgar, B., Pereira, E., Oliveira, M. B. P. P., Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D., Sokovic, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Extensive profiling of three varieties of *Opuntia* spp. fruit for innovative food ingredients. *Food Research International*, 101, 259–265.

Mena, P., Sanchez-Salcedo, E. M., Tassotti, M., Martinez, J. J., & Hernandez, F. (2016). Phytochemical evaluation of eight white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry clones grown in Spain based on UHPLC-ESI-MSn metabolomic profiles. *Food Research International*, 89, 1116–1122.

Mendes, A. C. N. Aproveitamento da casca e sementes de genótipos de maracujá azedo e silvestre. – Graduação Agronomia - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2018. 46 f.

Mendonça, S. R. Sistemas sustentáveis de esgotos: orientações técnicas para projeto e dimensionamento de redes coletoras, emissários, canais, estações elevatórias, tratamento e reuso na agricultura. São Paulo: Blucher, 2017.

Meng, Fan-Cheng., Zhou, Yan-Qing., Ren, D., Li, T., Lu, Jin-Jian., Wang, R., Wang, C., Lin, Li-Gen., Zhang, Xiao-Qi., Ye, Wen-Cai., & Zhang, Qing-Wen. (2018). Turmeric: a review of its chemical composition, quality control, bioactivity, pharmaceutical application. *In: Grumezeuscu, A., Holban, Alina-Maria. Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*, v. 7, 1. ed, p. 299-350.

Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, 56, 181–188.

Mona, I. M., Wafaa, A. A. & Elgindy, A. A. Chemical and Technological Studies on Chicory (*Cichorium Intybus L*) and Its Applications in Some Functional Food. J. Adv. Agric. Res. (Fac. Ag. Saba Basha) v. 14 (3), 2009.

Montefiori, M., Comeskey, D. J., Wohlers, M. & McGhie, T. K. (2009). Characterization and Quantification of Anthocyanins in Red Kiwifruit (*Actinidia* spp.). *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 57, 6856-6861. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf900800z>

Montero-Quintero, K. C., Moreno-Rojas, R., Molina, E. A., Colina-Barriga, M. S., & Sánchez-Urdaneta, A. B. Efecto del consumo de panes integrales con amaranto (*Amaranthus dubius* Mart; ex Thell;) sobre la respuesta glicémica y parámetros bioquímicos em ratas Sprague dawley. *Nutrición Hospitalaria*. v.31. n.1 Madrid ene. 2015. <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7695>

Moreira, G.E.G. Obtenção e caracterização de extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

Neves, N. Morfologia e fisiologia - o ciclo vegetativo anual. pp. 31-36. Em Antunes M., Kiwi: da produção à comercialização. *Ciência da Terra* (Universidade do Algarve). Algarve. 2008.

Nishiyama, I., Fukuda, T., Shimohashi, A. & Oota, T. (2008). Sugar and Organic Acid Composition in the Fruit Juice of Different *Actinidia* Varieties. *Food Sci. Technol. Res.*, 14 (1), 67 – 73.

Nowak, A., Czyzowska, A., Efenberger, M., & Krala, L. (2016). Polyphenolic extracts of cherry (*Prunus cerasus* L.) and blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as natural preservatives in meat products. *Food Microbiology*, 59, 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.004>

Okamoto, G., & Goto, S. (2005) Juice constituents in *Actinidia arguta* fruits produced in Shinjo, Okayama. Scientific Reports of the Faculty of Agriculture Okayama University, Okayama. [http://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/files/public/0/2/20160527165120358034/94\\_009\\_013.pdf](http://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/files/public/0/2/20160527165120358034/94_009_013.pdf).

Oliveira, F. S. Microencapsulação de extratos naturais ricos em flavonoides visando o desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedades quimiopreventivas. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Politécnico de Bragança. 2015.

Pandey, K.B., & Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 270-278.

Pardi, M. C., Santos, I. F., Souza, E. R. & Pardi, H. S. Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne. 1. ed. Goiás: UFG, 1995, 2v.

Park, Y., Namiesnik, J., Vearasilp, K., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Barasch, D., Nemirovski, A., Trakhtenberg, S. & Gorinstein, S. (2014). Bioactive compounds and the antioxidant capacity in new kiwi fruit cultivars. *Food Chemistry*, 165, 354-361.

Park, Y. S., Leontowicz, M., Leontowicz, H., Ham, K. S., Kang, S. G., Park, Y. K., Gorinstein, S. (2015). Fluorescence and ultraviolet spectroscopic evaluation of phenolic compounds, antioxidant and binding activities in some kiwi fruit cultivars. *Spectroscopy Letters*, 48(8), 586–592.

Paula, F. J. A. Análise elementar de sumos e águas. Dissertação (Mestrado) - Instituto Politécnico de Viseu, Escola Superior Agrária de Viseu, 2013.

Peng, Y. A., Lin-wang, K., Cooney, J. M., Wang, T., Espley, R., & Allan, A. C. (2019). Differential regulation of the anthocyanin profile in purple kiwifruit (*Actinidia* species). *Horticulture Research*. 6(1),163. DOI: 10.1038/s41438-018-0076-4

Pereira, E., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry*, *130*, 394–403.

Pinelli, P., Romani, A., Fierini, E., Remorini, D. & Agati, G. (2013). Characterisation of the Polyphenol Content in the Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) Exocarp for the Calibration of a Fruit-sorting Optical Sensor. *Phytochem Anal.*, *24*, 460-466.

Piovesana, A. & Bueno, M. M. (2013). Elaboração e aceitabilidade de biscoitos enriquecidos com aveia e farinha de bagaço de uva. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas, *16*, 68-72. <http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232013005000007>.

Raupp, D. S., Gardingo, J. R., Moreno, L. R., Hoffman, J. P. M., Matiello, R. R. & Borsato, A. V. (2008). Minimilho em conserva: avaliação de híbridos. *Acta Amazonica*. *38*, 509 -516. DOI: 10.1590/S0044-59672008000300016.

Ribeiro, A., Caleja, C., Barros, L., Santos-Buelga, C., Barreiro, M.F. & Ferreira, I.C.F.R. (2017). Rosemary extracts in functional foods: extraction, chemical characterization and incorporation of free and microencapsulated forms in cottage cheese. *Food & Function*, *7*, 2185-2196.

Ribeiro, A., Ruphuy, G., Lopes, J.C., Dias, M.M., Barros, L., Barreiro, F. & Ferreira, I.C.F.R. (2015). Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. *Food Chemistry*, *188*, 612–618.

Rodrigues, S., Calhella, R. C., Barreira, J. C. M., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Abreu, R. M. V., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). *Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts: Growth inhibitory activity on human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Research International*, *49*, 516–523.

Roriz, R.F.C. Aproveitamento dos resíduos alimentícios obtidos das centrais de abastecimento do Estado de Goiás s/a para alimentação humana. - Dissertação

(Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2012.

Routray, W. & Orsat, V. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 409–424.

Roy, R. (2015). Clinical Trial Barriers in Functional Foods and Nutrition in Clinical Aspects of Functional Foods and Nutraceuticals. Edited by Ghosh D., Bagchi, D. and Konishi T., Taylor & Francis Group, New York.

Rubió, L., Motilva, M.-J. & Romero, M.-P. (2013). Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 943- 953.

Ruiz, E. T. N. F. Análise de investimento em projetos Greenfield de bioenergia. Campinas: Alínea, 2015. 334 p.

Salgado, J. Alimentos funcionais. São Paulo: Oficina de Textos, 2017.

Santos-Buelga, C.; González-Manzano, S.; Dueñas, M.; González-Paramás, A.M. (2012). Extraction and isolation of phenolic compounds. *Methods Mol Biol.*, 864, 427-464.

Santos, J.P.V, & Ferreira, C.L.L.F. (2001). Alternativas para o aproveitamento de soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. *Revista do instituto de Laticínios*, 56, 44-50.

Savioli, G. Nutrição, saúde e fertilidade. Cachoeira Paulista: Editora Canção Nova, 2017.

Scalbert, A, Johnson, I.T. & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 215S–217S.

Scherever, R. (2009). Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 11, 442-449.

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

Schievano, A., D’Imporzano, G., & Adani, F. (2009). Substituting energy crops with organic wastes and agro-industrial residues for biogas production. *Journal of Environmental Management*, 90, 2537–2541.

SENAI – Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial. Industrialização de Carnes e Derivados. São Paulo: SENAI-SP Editora, 2016.

Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J., & Beta, T. (2014). Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science*, 59, 211-218.

Shibamoto, T., & Bjeldanes, L.F. Introdução à toxicologia de alimentos. Rio de Janeiro. Elsevier, 2014.

Silva, E.B. (2016). Aditivos Alimentares: aplicações e tecnologias. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 8 (5), 1-11.

Silveira S. V.; Anzanello, R.; Simonetto, P. R.; Gava, R.; Garrido, L. R.; Santos, R. S. S.; Girardi, C. L. Aspectos técnicos da produção de quivi. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012. 82 p.: il. color (Documentos / Embrapa Uva e Vinho, ISSN 1516-8107; 79).

Singleton, K. (2012). Kiwifruit Overview of Potential Health Benefits. *Nutrition Today*, 47, 133-147.

Sofia, P. K., Prasad, R., Vijay, V. K. & Srivastava, A. K. (2007). Evaluation of antibacterial activity of Indian spices against common foodborne pathogens. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(8), 910-915. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2006.01308.x

Soquetta, M. B. (2015). Caracterização físico-química, microbiológica e compostos bioativos de farinhas de casca e bagaço de kiwi (*Actinidia deliciosa*) e sua

aplicação em patê. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 110 f.

Soquetta, M.B., Stefanello, F.S., Huerta, K.M., Monteiro, S.S., da Rosa, C.S., & Terra, N.N. (2016). Characterization of physicochemical and microbiological properties, and bioactive compounds, of flour made from the skin and bagasse of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Chemistry*, 199, 471-478.

Souza, C.G. (2015). Extração de compostos bioativos e pectina da casca de maracujá utilizando sistema pressurizado e ultrassom. Fortaleza: UFC, 2015. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Souza, D. G. (2016). Caracterização da farinha da casca de jabuticaba e uso em bebidas lácteas saborizada com mamão. Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde – Rio Verde. – 2016. 69f.: Il. 21.

Sun-Waterhouse D, Wen I, Wibisono R, Melton LD, & Wadhwa S. (2009). Evaluation of the extraction efficiency for polyphenol extracts from by-products of green kiwifruit juicing. *Int J Food Sci Tech*, 44, 2644–2652.

Sun, Yujing, Donghong Liu, Jianchu Chen, Xingqian Ye, & Dong Yu. (2011). “Effects of Different Factors of Ultrasound Treatment on the Extraction Yield of the All-Trans- $\beta$ -Carotene from Citrus Peels.” *Ultrasonics Sonochemistry* 18(1):243–49.

Takebayashi, J., Iwahashi, N., Ishimi, Y. & Tai, A. (2012). Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA). *Food Chemistry* 134, 606–610.

Takwa, S., Caleja, C., Barreira, J.C.M., Soković, M., Achour, L., Barros, L., & Ferreira, I.C.F.R. (2018). *Arbutus unedo* L. and *Ocimum basilicum* L. as sources of natural preservatives for food industry: a case study using loaf bread. *LWT- Food Science and Technology*. 88, 47-55.

Tavarini, S., D’innocenti, E., Remorini, D., Massai, R. & Guidi, L. (2008). Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of ‘Hayward’ kiwifruit. *Food Chemistry*, 107, 282-288, 2008.

Teixeira, J.C. (2001). Utilização da polpa cítrica na alimentação de bovinos leiteiros. Parte I. *Milkbizz Tecnol.*, 1(3), 25-28.

Terra, N.L., El-Kik, R.M., Watte, M., Vieira, J.M.S., Marchi, D.S.M., David, C.N., Souza, C.G., & Teixeira, A.S. A nutrição e as doenças geriátricas. Porto Alegre: Edipucrs, 2011.

Tiwari, V., Tiwari, D., Patel, V., & Tiwari, M. (2017). Effect of secondary metabolite of *Actinidia deliciosa* on the biofilm and extra-cellular matrix components of *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Pathogenesis*, 110, 345-351

Verschuren, P.M. (2002). Functional Foods: Scientific and Global Perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88, 126-130.

Vichai, V. & Kirtikara, K. (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1, 1112-1116.

Villen, R.A. Tratamento biológico de efluentes. *In*: Lima, U. A.; Aquarone, E; Borzani, W; Schmidell, W. Biotecnologia industrial. São Paulo: Blucher, 2001. v. 3, 593 p.

Von Sperling, M. (2005). Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais. v1, p.452

Wang, C. & Li, S. (2015). Functional Foods and Nutraceuticals: Potential Role in Human Health in Clinical Aspects of Functional Foods and Nutraceuticals. Edited by Ghosh D., Bagchi, D. and Konishi T., Taylor & Francis Group, New York.

Wang, Y. et al. (2012). Influence of green banana flour substitution for cassava starch on the nutrition color, texture and sensory quality in two types of snacks. *LWT-Food Science and Technology*, 47,175-182.

Wang, Y., Li, L., Liu, H., Zhao, T., Meng, C., Liu, Z. & Liu, X. (2018). Bioactive compounds and *in vitro* antioxidant activities of peel, flesh and seed powder of kiwi fruit. *Food Science Technology*, 53, 2239-2245. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13812>

Wilga, J., Kot- Wasik, A., & Namiesnik, J. (2007). Comparison of extraction techniques of robenidine from poultry feed samples. *Talanta* 73, 812–819.

Woiciechowski, A. L., Carvalho, J. C., Spier, M. R., & Habu, S. (2013). *Biotechnologia de alimentos: Emprego de Resíduos Agroindustriais em Bioprocessos Alimentares*. 1 ed. Atheneu Editora, 2013. 30 p.

Wojdyło, A., Nowicka, P., Oszmianski, J. & Golis, T. (2017). Phytochemical compounds and biological effects of Actinidia fruits. *Journal of Functional Foods*, 30, 194–202.

Zandonadi, R.P. et al. (2012). Green banana pasta: an alternative for gluten-free diets. *Journal of the academy of nutrition and dietetics*, 112, 1068-1072

Zizovic, I., Stamenic, M., Ivanovic, J., Orlovic, A., Ristic, M., Djordjevic, S., Petrovic S.D., & Skala, D. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of sesquiterpenes from valerian root. *J. of Supercritical Fluids*, 43, 249–258.

Zhu, C. H., Gong, Q., Li, J. X., Zhang, Y., Yue, J. Q., & Gao, J. Y. (2013). Research progresses of the comprehensive processing and utilization of kiwifruit. *Storage and Process*, 13, 57–62.