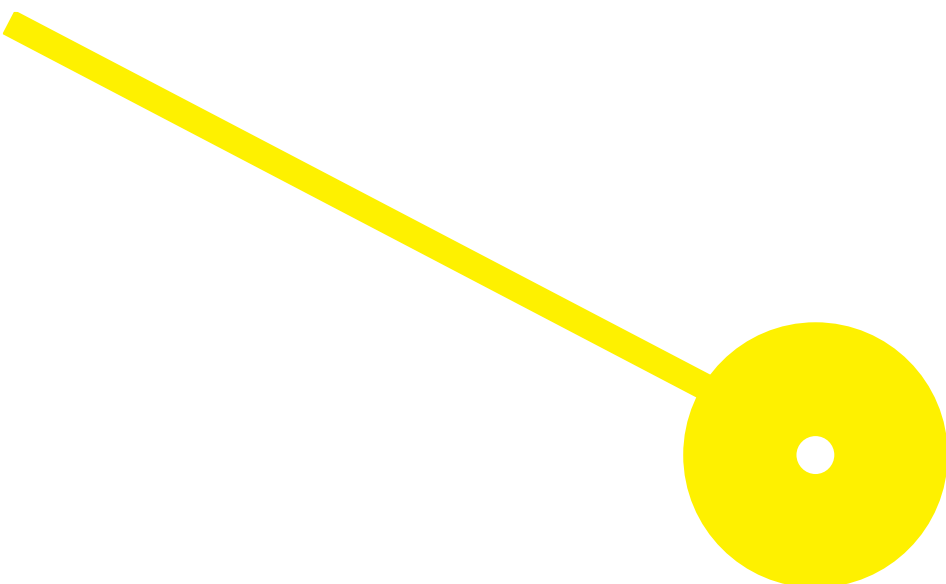




Avaliação da Atividade Antioxidante de Compostos Bioativos Provenientes da Fermentação de Excedentes de Romã

Beatriz dos Santos Dourado

09/2024





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



**Avaliação da Atividade Antioxidante de Compostos Bioativos Provenientes da
Fermentação de Excedentes de Romã**

Autor

Beatriz dos Santos Dourado

Orientadores

Professora Doutora Patrícia Correia / Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto;

LAQV-REQUIMTE, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto

Professora Doutora Luísa Barreiros / Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto;

LAQV-REQUIMTE, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmácia – Área de Especialização em Tecnologia do Medicamento e de Produtos de Saúde pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Não existem conquistas fáceis. Para além de força de vontade, é necessária muita dedicação, trabalho árduo e a determinação de darmos o nosso melhor. Os últimos dois anos foram marcados por isso mesmo, muito esforço, sacrifício, muitas mudanças e desafios constantes. Mas, no fim todo o esforço vale a pena, porque é através da perseverança que as maiores conquistas se tornam realidade.

Mais uma vez, esta conquista não teria sido possível sem o apoio incondicional dos meus pais. Mesmo à distância, são eles que me encorajam e me apoiam em todas as decisões, nos dias bons e nos dias menos bons, e graças a todo o esforço e amor deles, tive a possibilidade de escolher e estudar o que gosto. Por isso, é a eles que dedico mais esta conquista.

Também ao meu irmão, o meu melhor amigo, que está sempre presente e disponível a ajudar, nem que seja apenas com uma gargalhada para tornar o dia melhor. Espero que um dia ele me veja como um exemplo a seguir, e perceba que todo o esforço vale sempre a pena.

Quero também agradecer à minha orientadora Professora Doutora Patrícia Correia por todo o apoio e disponibilidade prestados e por acompanhar sempre o meu trabalho. E em especial à minha coorientadora Professora Doutora Luísa Barreiros, com quem desenvolvi a maior parte prática da minha investigação. Agradeço todo o apoio, toda a disponibilidade imediata que sempre demonstrou, a preocupação e compreensão em ajustar todos os horários de investigação com os meus horários de trabalho e por todas as palavras de ânimo e calma que sempre me transmitiu.

Agradeço também a todas as investigadoras com quem me cruzei nos laboratórios da FFUP, por toda a ajuda e disponibilidade que sempre demonstraram e pelo ótimo acolhimento.

Por último, quero agradecer aos meus avós, aos meus tios, à minha prima e ao meu padrinho por todo o apoio e força que me transmitiram constantemente, e por acreditarem sempre que eu sou capaz. Aos meus melhores amigos, Ana, Carolina, Ismael, Rafaela e Teresa que acompanharam todo o meu percurso académico e estiveram sempre presentes, obrigada por todas as palavras de coragem, pela companhia nos dias mais difíceis e por compreenderem a falta de tempo que estes anos exigiram.

Resumo

As frutas são uma fonte natural de antioxidantes, exibindo propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas, antidegenerativas, antienvhecimento e antidiabéticas. A romã (*Punica granatum*), uma fruta rica em compostos fenólicos, destaca-se pela sua elevada atividade antioxidante. O seu consumo e processamento geram resíduos, como cascas, sementes e membranas carpelares, ou mesmo fruta excedente. No entanto, a fermentação desses subprodutos pode melhorar as propriedades funcionais e a biodisponibilidade dos seus constituintes. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante dos produtos resultantes da fermentação de romã. Realizaram-se ensaios de fermentação de romãs excedentes no mercado e avaliou-se a atividade antioxidante através dos ensaios de Folin-Ciocalteu, CUPRAC e ABTS. Verificou-se que a romã apresentou atividade antioxidante em todas as condições testadas, confirmada pelos resultados dos três métodos. As amostras obtidas com casca e membranas apresentaram maior atividade antioxidante (213,08 – 607,79 $\mu\text{mol/g}$), seguidas da mistura de polpa, sementes e membranas (7,77 – 30,51 $\mu\text{mol/g}$), e a menor atividade foi observada apenas com polpa (1,91 – 7,03 $\mu\text{mol/g}$). Este estudo promove uma abordagem sustentável de aproveitamento de resíduos resultantes do desperdício alimentar e das indústrias transformadoras de frutas, indicando a possibilidade de os valorizar economicamente como recursos funcionais.

Palavras-chave: Romã; fermentação; atividade antioxidante; subprodutos; valorização

Abstract

Fruit is a natural source of antioxidants and has anti-inflammatory, anti-cancer, anti-degenerative, anti-ageing and anti-diabetic properties. Pomegranate (*Punica granatum*), a fruit rich in phenolic compounds, stands out for its high antioxidant activity. Its consumption and processing generates waste such as peels, seeds and carpel membranes, or even surplus fruit. However, fermenting these by-products can improve their functional properties and the bioavailability of their constituents. The main aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of the products resulting from pomegranate fermentation. Fermentation trials were carried out on surplus pomegranates on the market and their antioxidant activity was assessed using the Folin-Ciocalteu, CUPRAC and ABTS assays. Pomegranate was found to have antioxidant activity under all the conditions tested, confirmed by the results of the three methods. The samples obtained with peel and membranes showed the highest antioxidant activity (213.08 – 607.79 $\mu\text{mol/g}$), followed by the mixture of pulp, seeds and membranes (7.77 – 30.51 $\mu\text{mol/g}$), and the lowest activity was observed with pulp only (1.91 – 7.03 $\mu\text{mol/g}$). This study promotes a sustainable approach to utilising residues resulting from food waste and fruit processing industries, indicating the possibility of economically valuing them as functional resources.

Keywords: Pomegranate; fermentation; antioxidant activity; by-products; valorisation

Índice

Notação e Glossário	VI
Índice de Tabelas.....	VII
Índice de Gráficos.....	VII
Índice de Figuras.....	VIII
1. Introdução.....	1
1.1. Metodologias <i>in vitro</i> para a avaliação da atividade antioxidante	4
1.2. Objetivos.....	7
2. Materiais e Métodos.....	8
2.1. Matérias-primas	8
2.2. Reagentes e Soluções.....	8
2.3. Ensaio de Fermentação	9
2.4. Tratamento das Amostras.....	10
2.5. Determinação da Atividade Antioxidante das Amostras de Romã	11
2.5.1. Protocolo do Ensaio Folin-Ciocalteu em Microplaca	11
2.5.2. Protocolo do Ensaio CUPRAC em Microplaca.....	12
2.5.3. Protocolo do Ensaio ABTS em Microplaca.....	12
3. Resultados e Discussão.....	15
3.1. Monitorização do processo fermentativo por medição do pH.....	15
3.2. Determinação da atividade antioxidante das amostras.....	21
4. Conclusão.....	30
Referências Bibliográficas.....	32
Anexos.....	37

Notação e Glossário

ABTS – 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

CUPRAC – capacidade antioxidante redutora de iões cúpricos

°C – grau Celsius

FC – Folin Ciocalteu

g/mL – grama por mililitro

kg – kilograma

MM – massa molar

m/v – massa por volume

μL – microlitro

μm – micrómetro

μmol/g – micromole por grama

mg/L – miligrama por litro

mL – mililitro

mM – milimolar

nm – nanómetro

ROS – espécies reativas de oxigénio

TPC – teor de compostos fenólicos totais

v/v – volume por volume

W – Watt

Índice de Tabelas

Tabela 1. Fatores de diluição selecionados para análise das amostras de romã pelos diferentes métodos <i>in vitro</i>	22
Tabela 2. Valores da atividade antioxidante* ¹ dos ensaios de fermentação 1 e 2 da romã, determinados pelos diferentes métodos analíticos <i>in vitro</i> e valores de pH correspondentes....	24
Tabela 3. Valores da atividade antioxidante* ¹ do ensaio de fermentação 3 da romã, determinados pelos diferentes métodos analíticos <i>in vitro</i> e valores de pH correspondentes.....	26
Tabela 4. Percentagem de variação da atividade antioxidante (%) entre o tempo inicial e o tempo final de cada ensaio	27

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Variação do pH em função do tempo no ensaio 0.....	15
Gráfico 2. Variação do pH em função do tempo no ensaio 1.....	17
Gráfico 3. Variação do pH em função do tempo no ensaio 2.....	18
Gráfico 4. Variação do pH em função do tempo no ensaio 3.....	20

Índice de Figuras

Figura 1. Romã (<i>Punica granatum</i>)	2
Figura 2. Esquema da reação entre o complexo cobre-neocuproína e Trolox.....	6
Figura 3. Esquema da reação de redução do radical ABTS ⁺	6
Figura 4. Amostras dos matrizes do Ensaio 3	10
Figura 5. Representação do esquema em microplaca de 96 poços para análise das amostras em estudo.....	13
Figura 6. Exemplos dos resultados obtidos após realização de cada ensaio de avaliação da atividade antioxidante.....	14
Figura 7. Imagem dos matrizes correspondentes ao ensaio 1 da fermentação da romã.....	16
Figura 8. Imagem dos matrizes correspondentes ao ensaio 2 da fermentação da romã	18
Figura 9. Imagem dos matrizes correspondentes ao ensaio 3 da fermentação da romã	20
Figura 10. Valores de atividade antioxidante expressos em μmol por g de fruta obtidos para os diferentes ensaios de fermentação pelos diferentes métodos <i>in vitro</i> (Folin-Ciocalteu, CUPRAC, ABTS) e valores de pH correspondentes.....	25
Figura 11. Mapa de calor de correlação (<i>heatmap</i>) resultante da análise estatística de correlação dos valores de atividade antioxidante determinados pelos diferentes métodos <i>in vitro</i> e dos valores de pH.....	28

1. Introdução

Os compostos antioxidantes são substâncias que mesmo em baixas concentrações, podem retardar ou impedir a oxidação de um substrato através da neutralização de radicais livres e das espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem causar danos celulares (Santos-Sánchez et al., 2019). Estes compostos têm a capacidade de interromper reações de oxidação em cadeia e proteger assim as células e os tecidos do stress oxidativo, que leva à deterioração da qualidade dos alimentos, ao processo de envelhecimento das células e à propagação de doenças no organismo (López-Alarcón & Denicola, 2013). Os antioxidantes atuam por meio de vários mecanismos, incluindo a transferência de átomos de hidrogênio, transferência de elétrons e quelação de metais. Estes mecanismos ajudam a estabilizar os radicais livres, evitando danos oxidativos (Santos-Sánchez et al., 2019).

O interesse das indústrias pela utilização de antioxidantes naturais tem aumentado significativamente nos últimos anos, devido à possível toxicidade e efeitos indesejados que os antioxidantes sintéticos têm demonstrado (Gulcin, 2020). Além da sua aplicação em produtos alimentares e cosméticos, estes antioxidantes naturais surgem como alternativa promissora aos sintéticos, melhorando a estabilidade do produto e prevenindo a deterioração oxidativa durante as etapas de processamento e armazenamento (Lourenço et al., 2019).

As frutas são uma excelente fonte de antioxidantes naturais, que desempenham um papel crucial na proteção celular contra danos causados pelas ROS. A capacidade antioxidante das frutas está relacionada com a sua composição química, principalmente com a presença de compostos fenólicos, como flavonóides e ácidos fenólicos, juntamente com outros compostos biologicamente ativos, incluindo vitaminas (A, B, C e E), carotenoides e minerais. Estes antioxidantes naturais possuem várias funções biológicas adicionais, como propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas, antidegenerativas, antienvhecimento e antidiabéticas (Rahaman et al., 2023).

Reconhecida pelas suas propriedades antioxidantes já comprovadas (Derakhshan et al., 2018; Chan et al., 2022; Kandylis & Kokkinomagoulos, 2020) a romã (*Punica granatum*) é obtida de uma árvore caducifólia, a romãzeira e pertencente à família *Lythraceae*. A romã é uma baga redonda irregular, com uma casca externa que pode variar entre uma cor amarela e avermelhada, e o seu interior é subdividido por finas membranas carpelares que contêm pequenas sementes revestidas de uma polpa comestível, designada por arilos ou bagos (Figura 1)(Chan et al., 2022). É uma fruta nativa do médio Oriente, mas devido à sua boa adaptação a diversas condições de

clima e solo, é cultivada em muitas regiões geográficas diferentes, incluindo Portugal. Nos últimos anos, a área de cultivo da romã em Portugal expandiu-se, alcançando em 2018, 475 hectares com uma produção total de 3 milhões de toneladas e uma produtividade média de 6000 kg por hectare (Campos et al., 2022). A nível mundial, existe uma grande diversidade genética na romãzeira no que se refere ao tamanho do fruto, cor da casca, tamanho e cor dos arilos (variando do branco ao vermelho), dureza das sementes, teor de sumo, sabor e aroma (acidez e doçura). Esta diversidade é um fator que influencia o teor de fenóis e antocianinas, e consequentemente, a atividade antioxidante da fruta (Campos et al., 2022; Kandyliis & Kokkinomagoulos, 2020).



Figura 1. Romã (*Punica granatum*)

De facto, a romã é conhecida por ser uma das frutas mais ricas em compostos fenólicos com estudos que demonstram que a sua casca, sementes e sumo contêm uma grande variedade de compostos com elevada capacidade antioxidante. Entre eles, taninos, flavonóides e ácidos fenólicos, que exibem o seu poder antioxidante eliminando ou neutralizando radicais livres, quelando metais, afetando as vias de sinalização celular e modulando a expressão genética (Derakhshan et al., 2018; Lampakis et al., 2021; Vučić et al., 2019).

A romã é consumida principalmente fresca ou sob a forma de sumos e compotas. A análise da sua composição revela que, em média, a fruta inteira contém entre 38 a 50% de sumo, enquanto a casca e sementes representam, respetivamente, 39 a 53% e 8 a 12% do fruto (Campos et al., 2022; Kandyliis & Kokkinomagoulos, 2020; Venkitasamy et al., 2019). O consumo e processamento da romã geram grandes quantidades de subprodutos sólidos, geralmente considerados como resíduos sem valor (Campos et al., 2022; Venkitasamy et al., 2019).

Desses subprodutos, frequentemente descartados como resíduos, destacam-se a casca e as sementes. Diversos estudos têm evidenciado que as cascas contêm maiores quantidades de compostos bioativos e atividade biológica em comparação com o sumo, sendo uma fonte rica em compostos fenólicos, flavonóides como antocianinas e catequinas, taninos hidrolisáveis, fibras, vitaminas, minerais como cálcio, fósforo, magnésio, potássio e sódio, e polissacarídeos complexos. Assim, a casca apresenta atividades biológicas significativas como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, anticancerígenas e antivirais, além de poder contribuir para prevenir doenças metabólicas crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade (Alexandre et al., 2019; Gullón et al., 2020; Mo et al., 2022; Xiang et al., 2022).

No caso das sementes, estas são uma fonte rica de proteínas, fibras, vitaminas, minerais, pectina, açúcares, polifenóis e isoflavonas. A extração do seu óleo, rico em compostos bioativos, pode ser utilizada na elaboração de alimentos funcionais e produtos nutracêuticos (Kaseke et al., 2021; Khemakhem et al., 2021). Além disso, são uma fonte concentrada de diversos ácidos gordos, sobretudo ácidos gordos insaturados e fosfolípidos, apresentando assim benefícios para a saúde já comprovados, como propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, anticancerígenas e antioxidantes *in vivo* (Fourati et al., 2020; Leitão et al., 2022).

Processos como a fermentação podem modificar e melhorar a biodisponibilidade e as propriedades funcionais dos subprodutos, aumentando assim o valor dos produtos fermentados (Ruiz Rodríguez et al., 2021; Settembre-Malaterre et al., 2018). A fermentação é um processo anaeróbio através do qual os microrganismos, principalmente leveduras e algumas bactérias, convertem açúcares e amidos em álcool (fermentação alcoólica) ou ácidos carboxílicos (fermentação láctica ou acética). Os produtos fermentados de frutas, além de promoverem a conservação e a segurança alimentar da fruta, possuem substâncias que conferem melhores sabores e aromas, texturas e consistências melhoradas, maior valor nutricional e biodisponibilidade de nutrientes (Erskine et al., 2023; Leitão et al., 2022; Marco et al., 2017). Os compostos fenólicos presentes na maioria das frutas, têm sido amplamente estudados devido às suas propriedades antioxidantes e terapêuticas, que contribuem na prevenção de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, cânceros e doenças inflamatórias, como também na área da dermocosmética. A fermentação é uma tecnologia de baixo consumo de energia, com requisitos mínimos de investimento, que proporciona o acesso a produtos seguros, baratos e nutritivos, podendo assim contribuir para a redução do desperdício alimentar,

e sendo utilizada em várias culturas com recursos limitados (Leitão et al., 2022; Marco et al., 2017).

A fermentação espontânea, tradicionalmente utilizada para a produção de alimentos e bebidas como o pão, iogurte e cerveja artesanal, é também aplicada em laboratório. Este processo ocorre quando os microrganismos, nomeadamente bactérias, naturalmente presentes nas matérias-primas fermentam os compostos sem inoculação artificial de microrganismos exógenos. A biotransformação que ocorre durante a fermentação do ácido láctico altera o perfil e a natureza dos compostos bioativos presentes, melhorando as propriedades organolépticas e biológicas do produto obtido, aumentando assim o seu valor (de Oliveira et al., 2023; Saud et al., 2024).

1.1. Metodologias *in vitro* para a avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante de produtos alimentícios pode ser avaliada por diferentes ensaios *in vitro*, uma vez que nenhum método isolado consegue abranger com precisão os múltiplos mecanismos de ação antioxidante presentes em alimentos complexos. Cada método envolve uma reação química específica onde os antioxidantes presentes na amostra reagem com uma concentração definida do reagente do ensaio. A progressão da reação é monitorizada e o consumo do reagente do ensaio pelo extrato da amostra é quantificado instrumentalmente. Os valores resultantes são interpretados como a atividade antioxidante da amostra (George et al., 2022). As metodologias disponíveis diferem entre si em termos de substratos, sondas, condições reacionais e métodos de quantificação, dificultando a comparação dos resultados obtidos, uma vez que estes dependem das condições específicas de cada método. Para uma avaliação mais precisa e completa, é fundamental a utilização de vários métodos, que combinados consigam abranger os diversos mecanismos antioxidantes presentes na amostra.

Destacam-se o ensaio de Folin-Ciocalteu (FC), o ensaio de capacidade antioxidante redutora de iões cúpricos (CUPRAC) e o ensaio de remoção do catião radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), que são ensaios baseados na transferência de eletrões. Estes ensaios avaliam a capacidade de um antioxidante doar um eletrão a fim de reduzir iões metálicos (CUPRAC), grupos carbonilo (FC) e radicais livres (ABTS), resultando na formação de espécies menos reativas que mudam de cor quando reduzidas. A reatividade relativa destes ensaios baseia-se principalmente no potencial de desprotonação e ionização dos grupos funcionais reativos, sendo dependentes do pH (Munteanu & Apetrei, 2021a; Siddeeg et al., 2021a;

Zeb, 2020). Estes ensaios têm sido amplamente adotados pelas indústrias alimentícias e nutraceuticas para avaliação da atividade antioxidante, devido à sua simplicidade, possibilidade de aplicação simultânea a várias amostras, viabilidade e custo acessível. Além disso, a atividade antioxidante pode ser facilmente detetada por espectrofotometria, que é uma técnica instrumental disponível em muitos laboratórios (Magalhães et al., 2012; Munteanu & Apetrei, 2021).

O método de FC é amplamente utilizado para determinar o teor de compostos fenólicos totais (TPC) numa amostra. Este método baseia-se numa reação de transferência de elétrons, onde a espécie antioxidante atua como doadora de elétrons e o reagente FC atua como oxidante (Pérez et al., 2023). Durante o ensaio, os compostos fenólicos presentes na amostra reagem com o reagente FC em meio alcalino, resultando na produção de uma coloração azul (reação de oxidação-redução) cuja intensidade (absorvância medida a um comprimento de onda de 760 nm) é proporcional à concentração de fenólicos na amostra. O ácido gálico é o composto padrão de referência comumente usado para gerar uma curva de calibração precisa para comparação dos valores de absorvância, e os resultados do TPC são expressos geralmente em equivalentes de ácido gálico (Magalhães et al., 2008; Munteanu & Apetrei, 2021).

O método CUPRAC mede o potencial antioxidante de uma amostra através da redução do complexo de cobre-neocuproína $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ para $[Cu(Nc)_2]^+$ na presença de antioxidantes (Figura 2). A reação ocorre em meio de acetato de amónio, formando um complexo estável de cor amarela, cuja absorvância é registada no comprimento de onda máximo de absorção a 450nm, permitindo a quantificação precisa da capacidade antioxidante da amostra (Siddeeg et al., 2021b; Trofin et al., 2019). Este método apresenta várias vantagens em relação a outros métodos, nomeadamente a sua possível aplicabilidade a antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, e a realização da reação de redução que origina espécies coradas a um pH próximo do fisiológico (pH igual a 7) (Özyürek et al., 2011).

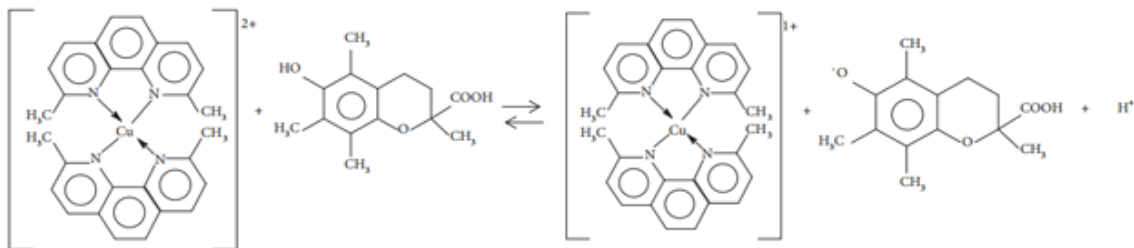


Figura 2. Esquema da reação entre o complexo cobre-neocuproína e Trolox

Fonte: Trofin, A. E. et al. (2019). CUPRAC voltammetric determination of antioxidant capacity in tea samples by using screen-printed microelectrodes. *J Anal Methods Chem*, 2019: article ID 8012758

O método ABTS é um método utilizado para medir a capacidade antioxidante de amostras, baseado na redução do radical corado $ABTS^{\bullet+}$. Neste ensaio, o radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$ é gerado pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio (Figura 3). Na presença de antioxidantes na amostra, o radical $ABTS^{\bullet+}$ é reduzido, resultando numa diminuição na absorvância (medida a um comprimento de onda de 734 nm) devido à descoloração do radical (Siddeeg et al., 2021b). Ao contrário dos outros métodos, a atividade antioxidante da amostra é determinada pela diminuição da absorvância, que indica a quantidade de $ABTS^{\bullet+}$ reduzida, e pode ser expressa em termos de percentual de inibição ou em relação a um padrão de referência como o Trolox. Este ensaio mede diretamente a capacidade da amostra de sequestrar radicais e pode ser utilizado para avaliar tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas, uma vez que o $ABTS^{\bullet+}$ é solúvel em solventes aquosos e orgânicos (Bessada et al., 2015). A redução do radical $ABTS^{\bullet+}$ é indicativa da atividade antioxidante da amostra, uma vez que somente compostos com potencial redox menor que o $ABTS^{\bullet+}$ serão capazes de reduzi-lo (Miguel-Chávez & Miguel-Chávez, 2017).

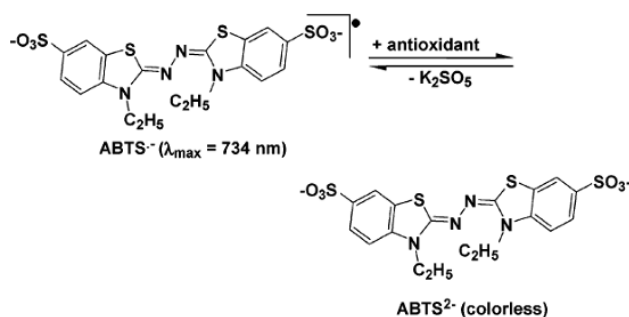


Figura 3. Esquema da reação de redução do radical $ABTS^{\bullet+}$

Fonte: Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, 53(6): 1841-1856

1.2. Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante dos produtos resultantes da fermentação microbiana de excedentes de romã. Estudou-se o efeito de diferentes condições experimentais, nomeadamente o tipo de substrato, na atividade dos produtos obtidos. Procedeu-se à adaptação e aplicação de métodos analíticos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos produtos fermentados obtidos, e determinou-se em que condições existiam mais compostos ativos com atividade antioxidante. Assim, este estudo procurou valorizar os subprodutos de fruta, particularmente da romã, como as cascas, sementes e membranas carpelares, explorando o seu potencial como fonte de compostos bioativos naturais e ingredientes funcionais, com aplicações promissoras nos setores alimentício, farmacêutico, cosmético e de produtos de higiene.

2. Materiais e Métodos

2.1. Matérias-primas

Na tentativa de utilizar excedentes de romã provenientes de indústrias transformadoras de fruta, foi realizada uma pesquisa no mercado português. As potenciais seis indústrias foram contactadas inicialmente por email (Anexo 1) e, posteriormente, por telefone. Devido à ausência de resposta em tempo útil para a execução do projeto (após 3 meses), optou-se por uma solução alternativa que passou por adquirir a romã inteira e não apenas excedentes resultantes da sua transformação.

As romãs utilizadas neste estudo foram adquiridas em colaboração com a cooperativa portuguesa Fruta Feia CRL que é composta por diversos produtores nacionais de frutas e legumes, cujo objetivo é reduzir as toneladas destes alimentos que são rejeitadas pelo mercado por não se encaixarem nos critérios estéticos de comercialização, criando assim um mercado alternativo, com preços mais reduzidos. Esta iniciativa visa gerar valor tanto para os produtores quanto para os consumidores, ao mesmo tempo que combate o desperdício alimentar. Embora a cooperativa não tenha fornecido uma identificação precisa da origem das romãs, sabe-se que provêm da região norte de Portugal. Até o estudo ser iniciado e durante a sua realização, as romãs foram conservadas no frio a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2. Reagentes e Soluções

Todos os produtos químicos utilizados eram de grau reagente analítico, sem purificação adicional. Para a preparação de todas as soluções, foi utilizada água ultrapura (resistividade $>18\text{ M}\Omega\text{ cm}$) de um sistema de purificação de água Arium (Sartorius). Os reagentes carbonato de sódio decahidratado (MM 286,1 g/mol, ref. 71360); e acetato de sódio trihidratado (MM 136,08 g/mol, ref. 32318-500 g) foram adquiridos ao fornecedor Fluka. Os reagentes Folin-Ciocalteu, 2 M no que se refere ao ácido (ref. 47641-100 mL-F); ácido gálico (MM 170,12 g/mol, ref. G7384-100G); acetato de amónio (MM 77,08 g/mol, ref. A1542-250G, armazenado entre $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$); neocuproína monohidratada (MM: 262,73 g/mol, ref. 72090); cobre (II), sob a forma de cloreto de cobre (II) di-hidratado (MM 170,48 g/mol, ref. 467847); Trolox ((±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico, MM 250,32 g/mol, ref. 238813-5g, armazenado entre

2-8 °C.); persulfato de potássio (MM 270,32 g/mol, ref. 60489) e o reagente ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), sal de diamônio, MM 548,68 g/mol, ref. 11557-1g, armazenado entre 2-8 °C) foram adquiridos ao fornecedor Sigma-Aldrich. Já o ácido clorídrico (HCl, 12,178 M, densidade de 1,2 g/mL, MM 36,46 g/mol, 37% m/m) foi adquirido à VWR Chemicals e o etanol absoluto ref. CL00.0505.2500 2,5L à Chem-Lab NV.

2.3. Ensaios de Fermentação

Os ensaios de fermentação implementados foram iniciados após lavagem com água corrente e corte da fruta. Procedeu-se à trituração dos bagos, sementes, membranas carpelares e da casca, utilizando um moinho (Taurus Aromatic II) a uma potência de 150 W, seguindo-se a pesagem numa balança analítica (Kern® ALS) da porção triturada de cada romã. A porção triturada foi dividida em partes iguais (controlado por pesagem) e transferida para dois balões de Erlenmeyer estéreis de 250 mL, protegidos com uma rolha de algodão, ou seja, cada condição foi testada em duplicado. O volume foi completado com água ultrapura estéril até perfazer 100 mL, homogeneizou-se e foram recolhidas amostras para dois tubos Falcon para medição do pH no tempo inicial. Os tubos Falcon foram armazenados a -20 °C para posterior processamento, enquanto os balões de Erlenmeyer foram colocados a incubar na estufa a 30 °C, iniciando o processo de fermentação sem qualquer agitação.

A monitorização do pH foi realizada ao longo do processo fermentativo por recolha de amostras pontuais, utilizando um medidor multiparâmetro Bante Instruments 900®. Em cada tempo, foi retirada sempre uma alíquota de 5 mL de cada balão de Erlenmeyer para dois tubos Falcon e fez-se a medição do pH em duplicado (Figuras 4A e 4B).

Primeiramente, foi realizado um ensaio preliminar (ensaio zero) com o objetivo de analisar a variação dos valores de pH ao longo do processo fermentativo, o tempo médio necessário para estabilização dos valores de pH e o valor mínimo de pH atingido.

No ensaio zero, a recolha foi realizada de forma direta, transferindo diretamente a amostra do balão de Erlenmeyer para os tubos Falcon. Nos restantes três ensaios (Ensaio 1, Ensaio 2 e Ensaio 3), foi utilizada uma espátula previamente esterilizada à chama, que permitiu homogeneizar a amostra no balão e fazer uma recolha mais precisa e representativa para os tubos Falcon.

Dos três ensaios adicionais realizados, dois foram realizados com a mesma matriz (Ensaio 1 e Ensaio 2), que continha uma mistura triturada dos bagos, sementes e membranas carpelares da

romã com exclusão da casca, em duplicado (Matraz 1 e 2). No terceiro e último ensaio (Ensaio 3), dois dos balões de Erlenmeyer continham uma mistura triturada dos bagos e sementes (Matraz 1 e 2), enquanto os outros dois balões continham uma mistura triturada da casca juntamente com as membranas carpelares (Matraz 3 e 4).

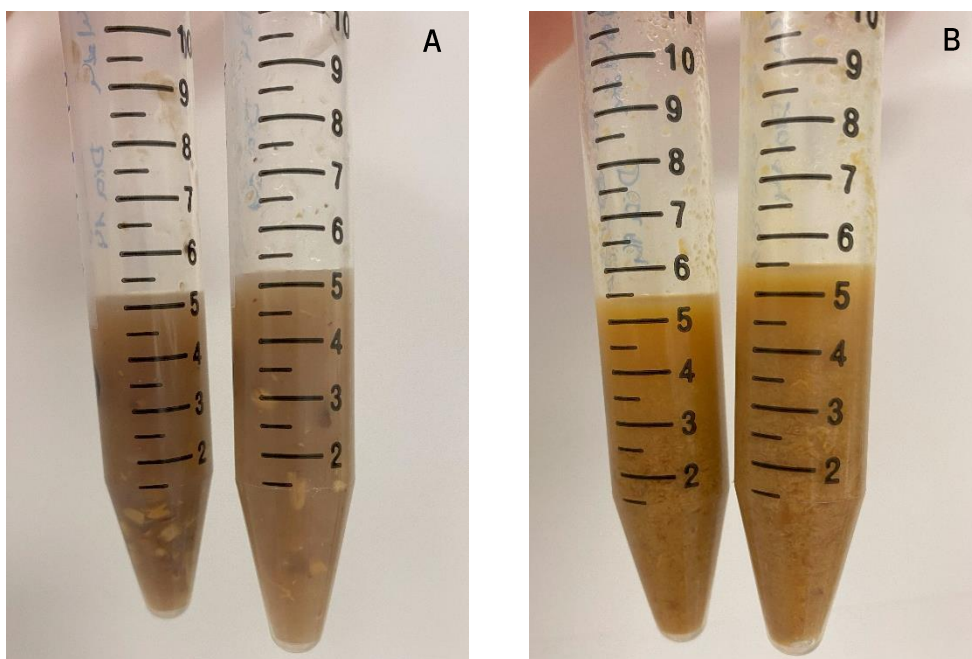


Figura 4. Amostras dos matrizes do Ensaio 3. A, Matrizes 1 e 2; B, Matrizes 3 e 4

2.4. Tratamento das Amostras

Das amostras recolhidas nos tubos Falcon e congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram selecionadas as amostras recolhidas no dia 0 (tempo inicial, t_i) e no último dia de fermentação (tempo final, t_f) de cada um dos três ensaios (Ensaio 1-3). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 15 min a uma temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gyrozen 1248R®) e o sobrenadante resultante foi filtrado por gravidade, através de filtro de pregas (papel de filtro Whatman nr. 1, poro $11\mu\text{m}$) colocado em funil de vidro. Os filtrados obtidos foram subsequentemente aspirados com uma seringa e submetidos a uma nova filtração através de um filtro de membrana estéril com um poro de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ para um tubo Eppendorf. Por fim, as amostras já tratadas foram congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise.

2.5. Determinação da Atividade Antioxidante das Amostras de Romã

Todos os ensaios antioxidantes foram realizados em formato de microplaca de 96 poços utilizando detecção espectrofotométrica e adaptados de procedimentos previamente desenvolvidos (Magalhães et al., 2012; Ronca et al., 2024). O leitor de microplacas (Synergy HT, Bio-Tek Instruments) utilizado foi controlado pelo software Gen5 (Bio-Tek Instruments). Todas as amostras foram analisadas em quadruplicado, usando três fatores de diluição.

Para a preparação das soluções stock e soluções de trabalho, foram utilizadas micropipetas (Gilson® com capacidades máximas correspondentes a 10, 20, 100, 200, 1000 e 5000 μL), uma micropipeta multicanal (Gilson®, com capacidade máxima de 200 μL), pipetas de Pasteur, balões volumétricos e provetas.

Para o ajuste e medição do pH das soluções tampão, foi utilizado um eletrodo de pH de vidro da Crison®, (pH METER GLP 22) e para auxiliar as diluições do reagente Trolox um banho de ultrassons Soltec® Sonica.

2.5.1. Protocolo do Ensaio Folin-Ciocalteu em Microplaca

Para a avaliação do teor de fenóis totais pelo reagente FC, foi inicialmente preparada uma solução tampão de carbonato de sódio decahidratado 24,3% (m/v), correspondente a 9% (m/v) de carbonato. O reagente comercial de FC foi diluído 3:10 (v/v) em água ultrapura tal como o ácido clorídrico 0,6 M usado como branco da amostra. Foi preparada uma solução stock de ácido gálico (1,2 mM) em água que foi diluída 1:10 (v/v) no mesmo solvente para preparação de uma solução intermédia e subsequentemente diluída também no mesmo solvente para preparação das diferentes soluções-padrão (0,006 mM-0,092 mM, 1,0- 15,0 mg/L), para fins de calibração. Na microplaca foi adicionado em cada poço correspondente 150 μL de cada solução padrão de ácido gálico em água ou 150 μL de cada diluição da amostra no mesmo solvente e 50 μL da solução de trabalho do reagente FC (diluição 3:10 v/v), exceto nos poços com o branco da amostra. Em seguida adicionou-se 100 μL de solução tampão carbonato (9% m/v) a cada poço. A redução a pH alcalino de sais de heteropoliácido de fosfotungstato-fosfomolibdato foi monitorizada a 760 nm durante 120 min, com leituras de 10 em 10 min. A absorção intrínseca das amostras foi avaliada pela adição de 50 μL de HCl (0,6 M) em vez do reagente FC, enquanto o branco do reagente foi conseguido pela adição de 150 μL de água em vez da amostra. O valor de atividade antioxidante, expresso em μmol ácido gálico/g de romã, foi calculado por interpolação do valor

de absorvância obtido para cada amostra após 120 min de reação na curva de calibração de ácido gálico.

2.5.2. Protocolo do Ensaio CUPRAC em Microplaca

Para o ensaio da capacidade antioxidante redutora cúprica (CUPRAC) foram preparadas uma solução de cobre (II) (10 mM), uma solução de neocuproína (7,5 mM) e uma solução tampão de acetato de amônio (1,0 M, pH 7), diluídas em água ultrapura. Na microplaca, foram colocados em cada poço 50 μ L de cada uma destas soluções, exceto nos poços do branco da amostra que só foi adicionado o tampão de acetato de amônio. Preparou-se também uma solução stock de Trolox a 1,0 mM em solução aquosa alcoólica 10% (v/v), e através da diluição desta solução no mesmo solvente, prepararam-se as soluções-padrão (15–200 μ M). Em seguida adicionou-se na microplaca 100 μ L de cada solução-padrão de Trolox em solução etanólica 10% (v/v) ou 100 μ L de cada diluição da amostra no mesmo solvente, nos poços correspondentes. A cinética de redução do complexo Cu (II) – neocuproína foi monitorizada a 450 nm durante 60 min, com leituras de 10 em 10 min. A absorção intrínseca das amostras foi avaliada pela adição de 100 μ L de água em vez de soluções de cobre (II) e neocuproína, enquanto o branco do reagente foi determinado substituindo a amostra por 100 μ L de solução etanólica 10% (v/v). O valor CUPRAC, expresso em μ mol Trolox/g de romã, foi calculado por interpolação do valor de absorvância obtido para cada amostra após 60 min de reação na curva de calibração do Trolox.

2.5.3. Protocolo do Ensaio ABTS em Microplaca

Para o ensaio de capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC), foi preparada uma solução do catião radical ABTS^{•+} pela mistura de volumes iguais de uma solução stock de ABTS (7 mM) e de uma solução de persulfato de potássio (2,45 mM), ambas dissolvidas em água. Esta mistura foi deixada em repouso entre 12–16 h à temperatura ambiente e abrigada da luz. No dia da análise, foram preparadas soluções padrão do radical ABTS^{•+} (88–350 mM) por diluição da solução stock numa solução tampão de acetato (50 mM, pH 4,6). Por interpolação na equação da curva de calibração, foi determinado o volume de solução radical ABTS^{•+} necessário para um valor de absorvância inicial de $0,90 \pm 0,02$. Para a preparação da solução stock de Trolox (0,7 mM), o composto foi diluído em solução etanólica 10% (v/v), que foi novamente diluído no mesmo

solvente para preparação de uma solução intermédia (0,07 mM) e das soluções-padrão (0,007–0,05 mM). Na microplaca, foi adicionado a cada poço 150 µL de cada solução-padrão de Trolox em solução etanólica 10% (v/v) ou 150 µL de cada diluição da amostra no mesmo solvente, e 150 µL da solução ABTS^{•+} em tampão acetato (50 mM, pH 4,6). A redução do radical corado ABTS^{•+} foi monitorizada a 734 nm, durante 300 min de reação, com leituras de absorvância de 10 em 10 min. Para avaliar a absorvância do radical ABTS^{•+} na ausência de espécies antioxidantes (controlo), foram adicionados ao radical 150 µL de solução etanólica 10% (v/v) em vez da amostra. Para avaliar a absorção intrínseca das amostras, foram adicionados 150 µL de tampão acetato a 150 µL de amostra. Os resultados foram expressos em µmol Trolox/g de romã após interpolação da diferença de absorvância calculada na curva padrão de Trolox.

A Figura 5 representa o esquema da microplaca utilizado para a realização dos diferentes ensaios de avaliação da atividade antioxidante da romã. Em cada análise foram incluídos o branco do reagente/ensaio (controlo), as soluções-padrão com diferentes concentrações, três diluições de cada amostra e o branco da amostra. A Figura 6 ilustra um exemplo dos resultados obtidos para cada um dos três ensaios.

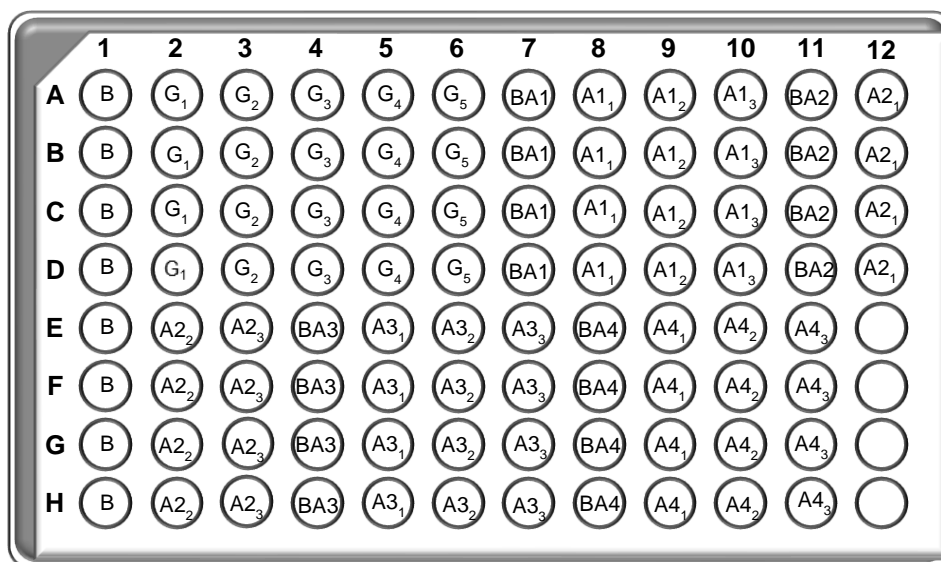


Figura 5. Representação do esquema em microplaca de 96 poços para análise das amostras em estudo. B, branco do ensaio; G₁₋₅, concentrações crescentes de solução-padrão, em que a letra muda consoante o composto (G= Ácido Gálico; T= Trolox); BA_i, branco da amostra para a concentração mais elevada de amostra testada; A_{i1-3}, diluições crescentes/concentrações decrescentes testadas para cada amostra em estudo.

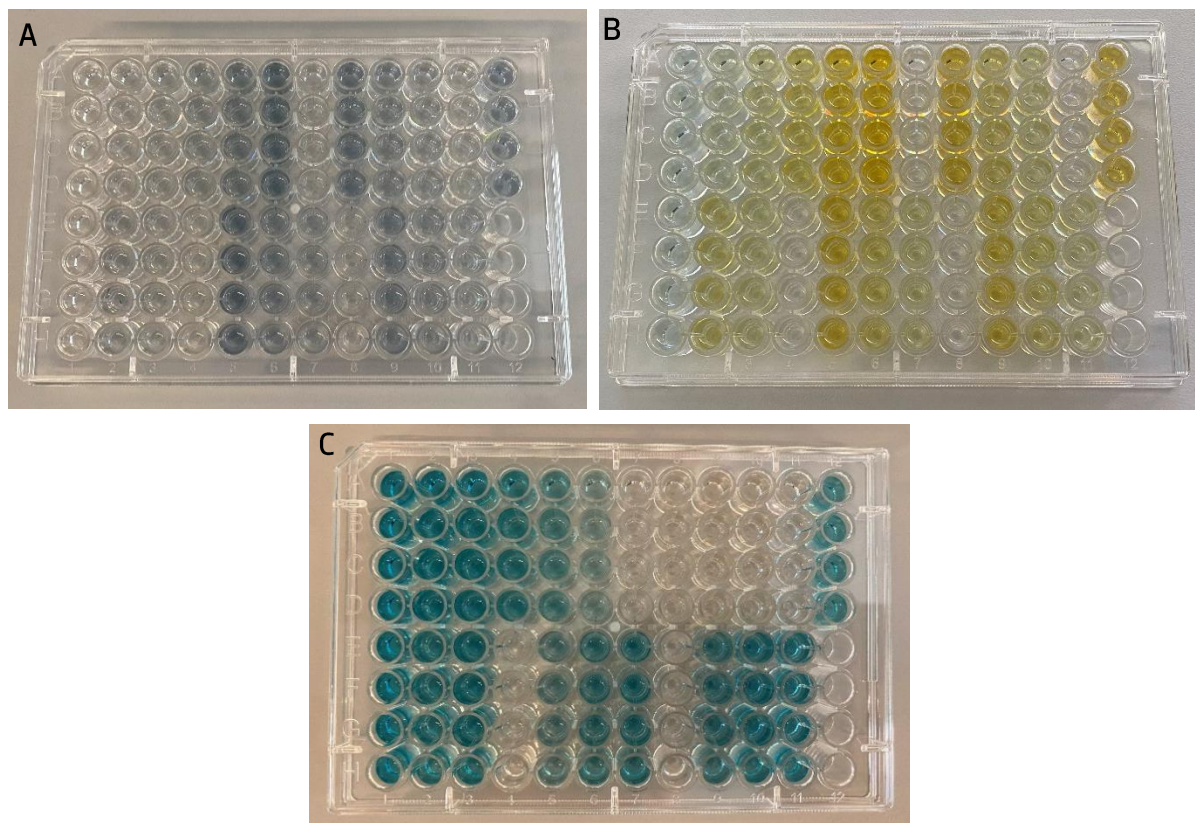


Figura 6. Exemplos dos resultados obtidos após realização de cada ensaio de avaliação da atividade antioxidante.
A, Folin-Ciocalteu; **B,** CUPRAC; **C,** ABTS

3. Resultados e Discussão

3.1. Monitorização do processo fermentativo por medição do pH

Como referido anteriormente na secção 2.3, foi realizado um ensaio preliminar ou designado por ensaio 0 utilizando a polpa, sementes e membranas carpelares da romã trituradas, com o objetivo de observar a variação de pH ao longo do tempo e perceber em que momento o pH atingia o seu valor mínimo que, em princípio, corresponderia ao final do processo fermentativo. Este ensaio apresentou inicialmente um pH que já era ácido (~4,5), que foi diminuindo de forma gradual ao longo do tempo, muito lentamente, durante os 23 dias que durou o ensaio, como representado no Gráfico 1. Os dois matrizes preparados apresentaram uma evolução dos valores de pH bastante equivalente.

Os valores de pH mais baixos foram registados a partir do 14^o dia (305 h), com um valor de 3,386 para o matraz 1 e 3,327 para o matraz 2 (Anexo 2). A partir desse dia, os valores de pH subiram ligeiramente até ao último dia do ensaio.

Neste primeiro ensaio, as medições de pH foram feitas com o elétrodo desinfetado com álcool a 70° e subsequentemente lavado com água ultrapura, colocando o elétrodo diretamente no interior do matraz, sendo que nos ensaios seguintes se retirou uma amostra de cada matraz para um tubo Falcon estéril, de forma a garantir que não havia contaminações externas e para posterior determinação da atividade antioxidante.

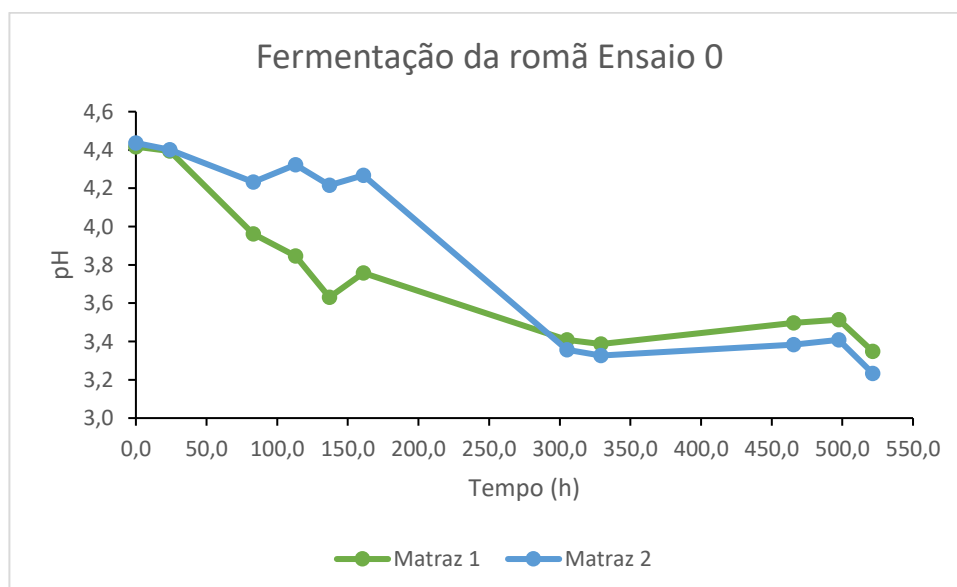


Gráfico 1. Variação do pH em função do tempo no ensaio 0

O ensaio seguinte (Ensaio 1) foi realizado com o mesmo substrato que o ensaio 0 (polpa, sementes e membranas carpelares trituradas) (Figura 7), observando-se a mesma tendência para um pH inicial ácido (-4,3). Este ensaio teve a duração de 19 dias e o comportamento de ambos os matrizes foi muito semelhante entre si e também equivalente ao observado no ensaio 0. A fermentação apresentou uma redução lenta e gradual do pH na qual foi possível distinguir várias fases (Gráfico 2). Numa primeira fase, por volta dos 4 dias (92,5 h) há uma diminuição mais acentuada do pH, até aproximadamente 3,7, que corresponderá ao consumo de compostos menos complexos e mais fáceis de degradar. Segue-se um patamar, com valores de pH aproximadamente constantes (3,7-3,8) durante 7 dias (258,5 h), um ligeiro aumento e depois nova redução do pH, sendo atingidos os valores de pH mais baixos ao 17º dia (381 h) de incubação, com registo de um pH de 3,716 para o matraz 1 e 3,458 para o matraz 2. A fase do patamar corresponderá ao período em que os microrganismos estarão a sintetizar as enzimas e componentes necessários para metabolizar os substratos mais complexos existentes no meio. Uma vez disponíveis estas enzimas e componentes, os compostos são degradados e há uma nova diminuição do pH, tal como observado. Após 2 dias, o pH voltou a subir ligeiramente e terminou-se o ensaio, tal como representado no Gráfico 2.



Figura 7. Imagem dos matrizes correspondentes ao ensaio 1 da fermentação da romã (esquerda, Matraz 1; direita, Matraz 2)

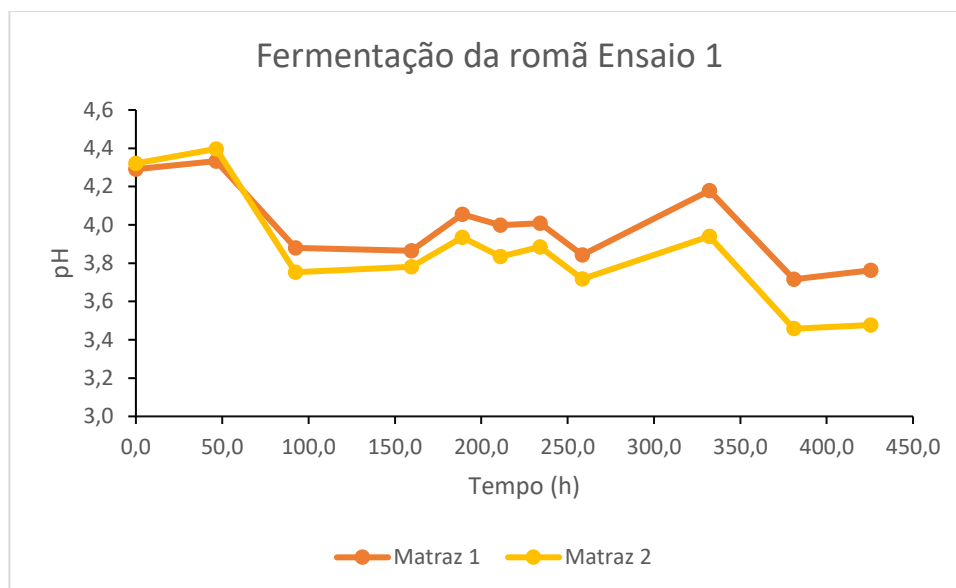


Gráfico 2. Variação do pH em função do tempo no ensaio 1

O ensaio que se seguiu, o ensaio 2, também foi realizado com o mesmo substrato que os anteriores (polpa, sementes e membranas carpelares trituradas) (Figura 8) e teve uma duração de 29 dias, sendo o ensaio mais prolongado devido às variações de pH que foram sendo observadas. Comparando com os ensaios anteriores, o valor de pH inicial foi semelhante aos anteriores, na zona ácida (-4,2). No caso do matraz 1, o perfil observado foi equivalente ao obtido no ensaio anterior, sendo possível distinguir as várias fases: aos 5-7 dias (93,6 - 165,6 h), uma diminuição mais acentuada do pH devido ao consumo de compostos mais simples e, após um patamar, uma nova redução do valor de pH correspondente ao consumo dos compostos mais complexos (Gráfico 3). Já o matraz 2 apresentou um perfil distinto: após uma redução de pH no 5º dia (93,6 h) este parâmetro aumentou significativamente até atingir um pH máximo de 4,679 no 16º dia (358,3 h) e, a partir daí, o valor de pH foi sempre diminuindo, atingindo o seu valor mínimo de 3,300 no 24º dia do ensaio (551,9 h) (Gráfico 3).

Verificou-se que, apesar de o matraz 2 ser um duplicado do matraz 1, em que ambos iniciaram com um pH ácido que mantiveram constante durante os primeiros três dias e em que os valores foram semelhantes entre si, o comportamento dos matrizes não foi semelhante ao longo do restante tempo.

Uma justificativa possível para a diferença acentuada no perfil do matraz 2 comparativamente ao matraz 1, pode estar relacionada com a heterogeneidade da amostra, ou seja, o matraz 2 pode conter uma maior porção de determinadas partes da romã, o que influencia a variabilidade das

condições microbiológicas entre amostras. Uma potencial contaminação pode ter contribuído para o perfil distinto.



Figura 8. Imagem dos matrizes correspondentes ao ensaio 2 da fermentação da romã (esquerda, Matraz 1; direita, Matraz 2)

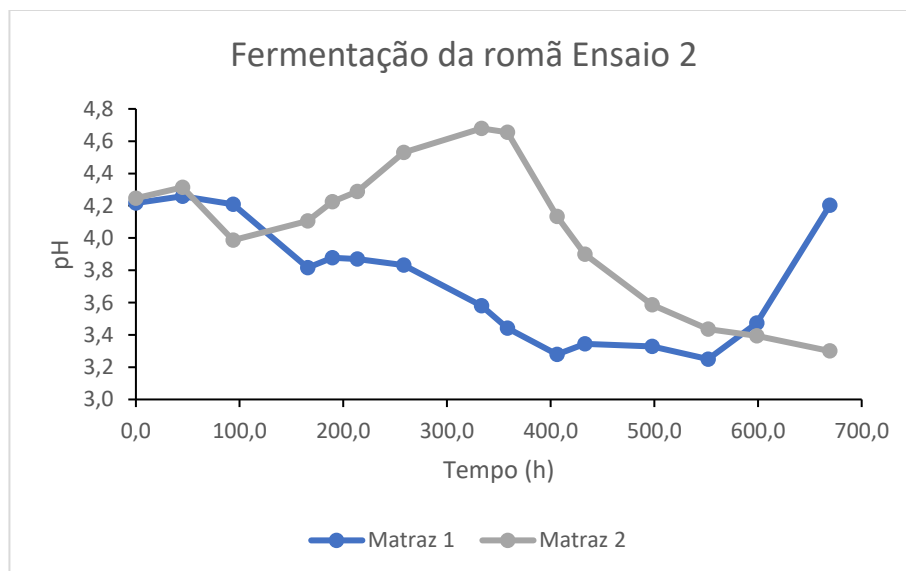


Gráfico 3. Variação do pH em função do tempo no ensaio 2

No caso do ensaio 3, este foi realizado com um substrato diferente dos anteriores pois fez-se a separação da polpa e sementes trituradas que foram adicionadas ao matraz 1 e 2, enquanto ao matraz 3 e 4 foram adicionadas a casca e membranas carpelares da romã trituradas (Figura 9). As restantes condições do ensaio foram as mesmas que as utilizadas anteriormente. Em cada tempo, recolheram-se quatro em vez de duas amostras, uma vez que foram preparados e avaliados quatro matrizes no total. Tal como os restantes ensaios, iniciou-se o ensaio 3 com um pH ácido (3,8-4,5) e o ensaio teve uma duração de 18 dias. O perfil de variação de pH observado no ensaio 3 foi equivalente aos ensaios anteriores. Tal como se pode observar no Gráfico 4, os valores de pH dos matrizes 1 e 2, correspondentes à polpa e sementes, atingiram o valor mínimo no mesmo dia (9º dia; 186,3 h), com um valor de 3,103 para o matraz 1 e 3,146 para o matraz 2. Já os valores de pH do matraz 3 e 4, correspondentes à casca e membranas carpelares, apresentaram uma diminuição mais acentuada até ao 3º dia (66,6 h), seguida de um período em que os valores de pH se mantiveram aproximadamente constantes (Gráfico 4). Os valores mínimos de pH foram 3,181 para o matraz 3 e 3,248 para o matraz 4, sendo atingidos no 15º e 12º dias de incubação, respetivamente.

Comparando os resultados obtidos para todos os matrizes (Gráfico 4), é possível verificar que os quatro matrizes apresentaram um comportamento muito semelhante até ao 9º dia (186,3 h) e, a partir desse tempo o matraz 1 apresentou um perfil ligeiramente diferente, com aumento de pH até ao 16º dia (360 h), contrariamente aos restantes matrizes que se mantiveram com um valor de pH aproximadamente igual até ao final do ensaio.

Uma justificação possível para a diferença no perfil do matraz 1 a partir do 9º dia (186,3 h), comparativamente aos restantes matrizes, pode estar relacionada com a heterogeneidade da amostra, uma alteração na fermentação ou uma possível contaminação.



Figura 9. Imagem dos matrizes correspondentes ao ensaio 3 da fermentação da romã (esquerda, Matraz 1 e 2- polpa e sementes; direita, Matraz 3 e 4- casca e membranas carpelares)

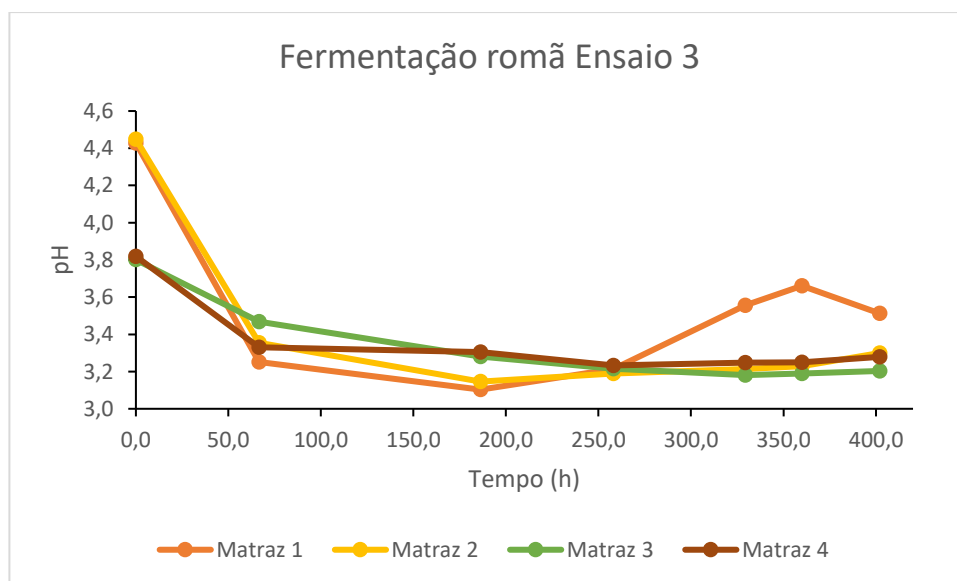


Gráfico 4. Variação do pH em função do tempo no ensaio 3

3.2. Determinação da atividade antioxidante das amostras

Para a implementação dos vários ensaios, foram ajustados e testados diferentes fatores de diluição para cada amostra de modo a selecionar aqueles que permitiam a obtenção de um perfil cinético semelhante ao do composto utilizado como padrão em cada ensaio, assim como um sinal instrumental que estivesse compreendido na gama da curva de calibração utilizada. Como pode ser observado na Tabela 1, foi necessário utilizar fatores de diluição mais elevados para a análise das amostras pelo método ABTS. Além disso, como era esperado, devido aos elevados valores de atividade antioxidante reportados na literatura para a casca (Alexandre et al., 2019; Gullón et al., 2020; Mo et al., 2022; Xiang et al., 2022) os fatores de diluição mais elevados foram aplicados para a análise das amostras dos matrizes 3 e 4 por qualquer um dos métodos implementados. Observou-se também uma concordância entre os fatores de diluição utilizados para as amostras dos dois matrizes dos ensaios 1 e 2, o que era de certo expectável, tendo em conta que apresentam o mesmo tipo de substrato e foram preparados nas mesmas condições. A mesma concordância foi observada com as amostras dos matrizes 1 e 2 do ensaio 3, que para todos os métodos, foram as amostras para as quais foram necessários fatores de diluição mais baixos, sendo que a sua matriz difere também dos restantes matrizes pois apresenta apenas a polpa e sementes trituradas da romã.

Nas diluições testadas para todas as amostras, nunca se verificou um valor de absorção intrínseca da amostra que interferisse, ou seja, todos os valores apresentados podem ser atribuídos à atividade antioxidante da amostra.

Tabela 1. Fatores de diluição selecionados para análise das amostras de romã pelos diferentes métodos *in vitro*

Amostras	Fatores de Diluição das amostras		
	Folin- Ciocalteu	CUPRAC	ABTS
Matraz 1 e 2 Ensaio 1	200; 500 ; 1000* ¹	100 ; 200 ; 400	1000 ; 1250 ; 1500
Matraz 1 e 2 Ensaio 2	200 ; 500 ; 1000	100 ; 200 ; 400	1000 ; 1250 ; 1500 ²
Matraz 1 e 2 Ensaio 3	50 ; 100 ; 200	20 ; 50 ; 100	100 ; 150 ; 200
Matraz 3 e 4 Ensaio 3	1500 ; 2000 ; 2500	1000 ; 1500 ; 2000	5000 ; 5500 ; 6000

*¹No caso do matraz 1, apenas foram consideradas 2 diluições para os cálculos (500 e 1000 para t_r ; 200 e 500 para t_f)

*²No caso do matraz 2, apenas foi considerada 1 diluição para os cálculos do t_r (1000)

Como é possível verificar na Tabela 2 e na Figura 10, no caso dos ensaios 1 e 2 realizados com polpa, sementes e membranas carpelares da romã trituradas, o valor final de atividade antioxidante, expresso por g de romã, foi sempre inferior ao valor inicial, independentemente do método de avaliação da atividade antioxidante e do ensaio de fermentação. Relativamente aos valores de pH, também apresentados na Tabela 2, foi possível observar que também há uma diminuição, que acompanha a diminuição da atividade antioxidante da amostra, com exceção do matraz 1 do ensaio 2, mas não é possível afirmar que existe uma ligação entre estes valores e que uma redução do pH leva a uma diminuição da atividade antioxidante.

Tal como observado no Gráfico 3 (secção 3.1), o matraz 2 do ensaio 2 apresentou um comportamento diferente do matraz 1, o que poderá estar relacionado com, por exemplo, a heterogeneidade da romã triturada que levou a que dois matrizes não fossem réplicas exatas. Tendo em conta que o processo fermentativo ocorreu de maneira diferente, esta poderá ser a causa da diferença de valores de atividade antioxidante apresentados para o matraz 2. De facto, os valores de atividade antioxidante obtidos para o matraz 2 foram aproximadamente metade dos valores observados para o matraz 1, que apresentou valores não muito distintos do ensaio 1. A comparação global dos valores de atividade antioxidante obtidos no ensaio 1 e no ensaio 2

evidenciou ligeiras diferenças que podem ser atribuídas ao facto de os ensaios, apesar de utilizarem o mesmo processo e a mesma matriz, serem realizados com uma romã diferente. Além disso, a divisão não homogénea da romã pelos matrizes quando é cortada e triturada, uma vez que é feita pela equivalência do peso da romã já triturada, pode levar a que um dos matrizes contenha em maiores proporções alguma das partes da romã, influenciando depois os valores de atividade antioxidante obtidos. Um ponto importante a destacar é que, apesar de os valores de atividade antioxidante entre os matrizes do mesmo ensaio terem sido ligeiramente diferentes, a variação observada do tempo inicial para o tempo final apresentou, percentualmente, comportamentos semelhantes. Essa comparação percentual de como é que a atividade antioxidante variou durante o tempo dos ensaios está apresentada na Tabela 4.

Uma análise comparativa dos resultados obtidos pelos diferentes métodos para os ensaios 1 e 2 (Tabela 2 e Figura 10), permitiu observar que, de um modo geral, o método CUPRAC foi o que apresentou valores de atividade antioxidante mais baixos, o método Folin-Ciocalteu valores intermédios enquanto o método ABTS apresentou os valores mais elevados.

Verificou-se ainda que os valores de atividade antioxidante determinados pelos diferentes métodos apresentaram uma boa correspondência, tal como descrito na literatura (George et al., 2022).

Tabela 2. Valores da atividade antioxidante*¹ dos ensaios de fermentação 1 e 2 da romã, determinados pelos diferentes métodos analíticos *in vitro* e valores de pH correspondentes

Amostras	Folin- Ciocalteu Eq. Ácido Gálico ($\mu\text{mol/g}$)	CUPRAC Eq. Trolox ($\mu\text{mol/g}$)	ABTS Eq. Trolox ($\mu\text{mol/g}$)	Valor de pH
Matraz 1 Ensaio 1 t _i	21,11 \pm 0,34	14,23 \pm 1,21	30,51 \pm 0,64	4,29
Matraz 1 Ensaio 1 t _f	16,56 \pm 0,44	13,36 \pm 1,05	29,59 \pm 0,92	3,76
Matraz 2 Ensaio 1 t _i	16,29 \pm 1,34	12,75 \pm 0,85	25,35 \pm 0,69	4,32
Matraz 2 Ensaio 1 t _f	13,23 \pm 0,71	11,75 \pm 1,08	21,62 \pm 1,04	3,48
Matraz 1 Ensaio 2 t _i	22,21 \pm 1,00	22,19 \pm 2,74	30,25 \pm 0,52	4,22
Matraz 1 Ensaio 2 t _f	16,55 \pm 0,95	13,15 \pm 0,83	17,01 \pm 0,40	4,20
Matraz 2 Ensaio 2 t _i	11,93 \pm 1,32	13,56 \pm 0,49	18,06 \pm 0,83	4,25
Matraz 2 Ensaio 2 t _f	10,29 \pm 0,57	7,77 \pm 0,52	10,81 \pm 0,74	3,30

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão para pelo menos duas diluições das amostras em quadruplicado ($8 \leq n \leq 12$).

Em todos os casos, o valor do desvio padrão relativo foi inferior ou igual a 15%.

*¹Exemplo do processamento de dados realizados para cada método nos Anexos 3, 4, 5 e 6

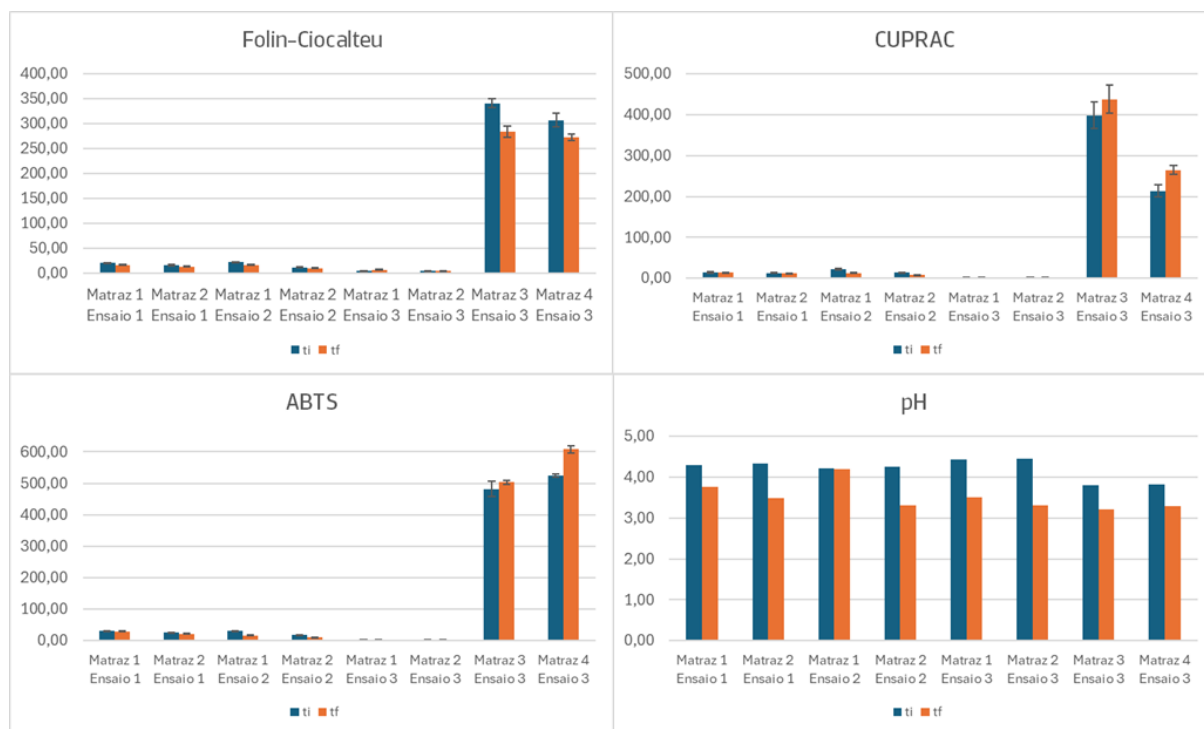


Figura 10. Valores de atividade antioxidante expressos em μmol por g de fruta obtidos para os diferentes ensaios de fermentação pelos diferentes métodos *in vitro* (Folin-Ciocalteu, CUPRAC, ABTS) e valores de pH correspondentes

No ensaio 3 foi possível verificar que, ao contrário dos ensaios anteriores, os valores de atividade antioxidante finais foram superiores aos iniciais, excetuando os valores determinados para os matrizes 3 e 4 pelo método Folin-Ciocalteu (Tabela 3 e Figura 10).

Relativamente ao pH, observou-se novamente a exemplo dos ensaios anteriores, uma diminuição do seu valor que acompanhou o aumento da atividade antioxidante da amostra. Da mesma forma que referindo anteriormente, não é possível afirmar que existe uma relação direta entre estes valores e que uma redução do pH levou a um aumento da atividade antioxidante. No caso do matraz 1, em que o perfil da fermentação foi diferente dos restantes matrizes a partir do 9º dia (Gráfico 4, secção 3.1), esta diferença não parece ter tido grande influência sobre a atividade antioxidante, pois os valores foram semelhantes ao seu duplicado Matraz 2.

Tabela 3. Valores da atividade antioxidante*¹ do ensaio de fermentação 3 da romã, determinados pelos diferentes métodos analíticos *in vitro* e valores de pH correspondentes

Amostras	Folin- Ciocalteu Eq. Ácido Gálico ($\mu\text{mol/g}$)	CUPRAC Eq. Trolox ($\mu\text{mol/g}$)	ABTS Eq. Trolox ($\mu\text{mol/g}$)	Valor de pH
Matraz 1 Ensaio 3 t _r	5,07 \pm 0,11	2,70 \pm 0,33	3,45 \pm 0,35	4,43
Matraz 1 Ensaio 3 t _r	7,03 \pm 0,40	3,26 \pm 0,23	4,16 \pm 0,16	3,51
Matraz 2 Ensaio 3 t _r	4,18 \pm 0,17	1,91 \pm 0,15	2,76 \pm 0,08	4,45
Matraz 2 Ensaio 3 t _r	4,55 \pm 0,18	3,21 \pm 0,23	3,17 \pm 0,13	3,30
Matraz 3 Ensaio 3 t _r	341,14 \pm 8,31	398,54 \pm 32,14	481,90 \pm 23,78	3,80
Matraz 3 Ensaio 3 t _r	283,36 \pm 11,08	437,72 \pm 33,65	503,14 \pm 6,14	3,20
Matraz 4 Ensaio 3 t _r	306,81 \pm 13,49	213,08 \pm 14,60	523,84 \pm 5,11	3,82
Matraz 4 Ensaio 3 t _r	272,49 \pm 6,11	264,71 \pm 11,17	607,79 \pm 11,08	3,28

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão para pelo menos duas diluições das amostras em quadruplicado ($8 \leq n \leq 12$).

Em todos os casos, o valor do desvio padrão relativo foi inferior ou igual a 15%.

*¹Exemplo do processamento de dados realizados para cada método nos Anexos 3, 4, 5 e 6.

Comparando os valores obtidos neste ensaio de fermentação, os valores de atividade antioxidante determinados pelos três métodos foram muito semelhantes para os matrizes 1 e 2. No caso dos matrizes 3 e 4, destacam-se os valores mais elevados obtidos pelo método ABTS, seguido dos métodos CUPRAC e Folin-Ciocalteu com valores ligeiramente mais baixos, mas ambos muito próximos. Apesar de os valores de atividade antioxidante entre os matrizes do mesmo ensaio terem sido ligeiramente diferentes, apresentaram a mesma tendência de variação, que pode ser confirmada pelo cálculo dos valores de percentagem de variação da atividade antioxidante (Tabela 4).

Tabela 4. Percentagem de variação da atividade antioxidante (%) entre o tempo inicial e o tempo final de cada ensaio

	Amostras	Folin- Ciocalteu %	CUPRAC %	ABTS %
Ensaio 1	Matraz 1	-21,6	-6,1	-3,0
	Matraz 2	-18,8	-7,8	-14,7
Ensaio 2	Matraz 1	-25,5	-40,7	-43,7
	Matraz 2	-13,8	-42,7	-40,1
Ensaio 3	Matraz 1	+38,7	+20,7	+20,5
	Matraz 2	+8,8	+68,9	+14,8
	Matraz 3	-16,9	+9,8	+4,4
	Matraz 4	-11,2	+24,2	+16,0

Para avaliar se os valores de atividade antioxidante determinados pelos diferentes métodos estavam estatisticamente correlacionados entre si e com os valores de pH, foi realizada uma estatística de correlação (correlação de Pearson) dos valores apresentados nas Tabelas 2 e 3. Os resultados obtidos (Figura 11) evidenciaram que os valores de atividade antioxidante por g de fruta obtidos pelos métodos Folin-Ciocalteu, CUPRAC e ABTS estão significativamente correlacionados para um nível de confiança de 95%, com um valor de $p < 0,0001$. A análise de correlação (Figura 11) também revelou que o valor de pH não está significativamente relacionado com os valores de atividade antioxidante obtidos pelos diferentes ensaios, confirmando o que já se suspeitava por observação e comparação dos valores obtidos.

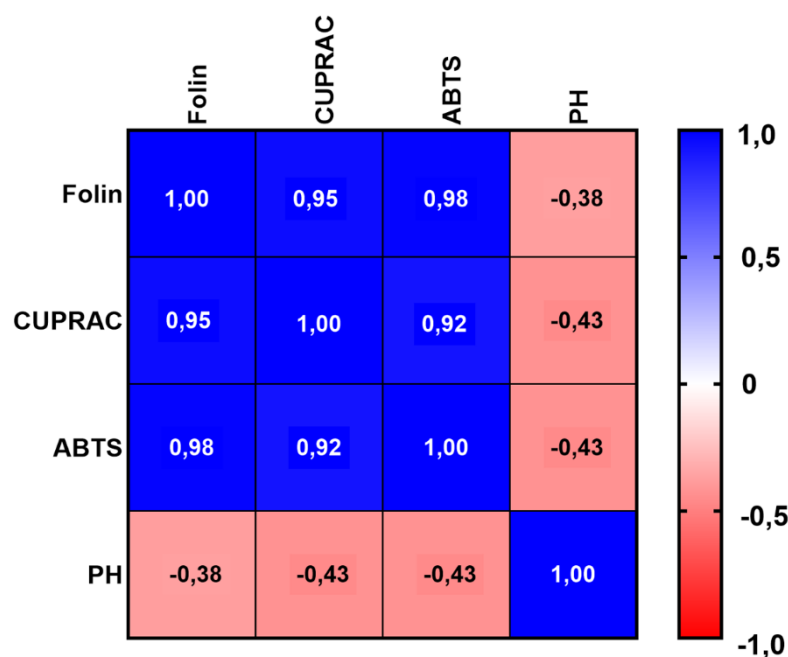


Figura 11. Mapa de calor de correlação (*heatmap*) resultante da análise estatística de correlação dos valores de atividade antioxidante determinados pelos diferentes métodos *in vitro* e dos valores de pH.

Uma análise global de todos os valores de atividade antioxidante determinados nos vários ensaios revelou que as amostras que apresentaram maior atividade antioxidante em todos os métodos (Folin-Ciocalteu, CUPRAC e ABTS) foram as amostras dos matrizes 3 e 4 do ensaio 3 que continham a casca e membranas carpelares trituradas da romã. Os valores de atividade antioxidante determinados para as amostras de casca e membranas carpelares foram cerca de 60-150x superiores aos valores determinados para os matrizes 1 e 2 do mesmo ensaio, que continham a polpa e sementes. Além disso, foram cerca de 20x superiores aos valores

determinados para os ensaios de fermentação 1 e 2. Este resultado está de acordo com o esperado, pois segundo a literatura, a casca apresenta elevados valores de atividade antioxidante e geralmente há uma boa correlação entre os resultados dos três métodos *in vitro* utilizados neste trabalho. A atividade antioxidante observada na casca da romã deve-se à elevada presença de compostos fenólicos, particularmente de taninos hidrolisáveis, cuja concentração é predominantemente superior na casca em comparação com as outras partes da fruta. Assim, a elevada concentração fitoquímica da casca é considerada eficaz por si só, sem necessidade de adição de outras partes da fruta. Além disso, aproximadamente 30 % do total de antocianinas, compostos com reconhecida atividade antioxidante, presentes na romã encontram-se concentrados na casca (Akhtar et al., 2015; Magangana et al., 2020).

Desta forma, é possível perceber que os valores elevados de atividade antioxidante que os matrizes 3 e 4 apresentaram, se devem exclusivamente à presença da casca, pois as membranas carpelares estão também presentes nos matrizes 1 e 2 dos ensaios anteriores (Ensaio 1 e 2) e os valores de atividade antioxidante determinados, quando comparados com estes, foram muito inferiores. Assim, a realização de ensaios de fermentação com a casca de romã parece ser promissora para a obtenção de compostos bioativos com elevada atividade antioxidante. De uma forma geral, o processo de fermentação tende a aumentar a atividade antioxidante das amostras devido a várias transformações bioquímicas promovidas pelos microrganismos durante a fermentação, mas dependendo sempre do tipo de substrato fermentado, dos microrganismos utilizados e das condições do processo (como tempo, temperatura e pH). Neste estudo específico, não se verificou um aumento da atividade antioxidante em todos os ensaios, possivelmente devido a variações no processo fermentativo relacionadas com a heterogeneidade da romã triturada, como já mencionado anteriormente.

4. Conclusão

Os três ensaios *in vitro* selecionados para este estudo, Folin-Ciocalteu, CUPRAC e ABTS são métodos amplamente utilizados, caracterizados pela sua facilidade de implementação e reprodutibilidade em diferentes condições experimentais, com compostos-padrão bem definidos. A realização destes ensaios em microplacas permitiu a obtenção simultânea de múltiplos resultados, considerando-se assim ensaios de elevado rendimento.

Os resultados obtidos permitiram concluir que as amostras que continham a casca triturada juntamente com as membranas carpelares foram as que apresentaram maior atividade antioxidante e com valores bastante elevados, quando comparados com as outras amostras. Este resultado era de certo modo esperado, tendo em conta a literatura já publicada. A realização de outros ensaios com diferentes substratos, permitiu uma avaliação comparativa de diferentes condições, onde foi possível verificar que a polpa juntamente com as sementes foram as que apresentaram uma atividade antioxidante mais baixa. Comparando com as amostras que continham polpa, sementes e membranas carpelares, ou seja, todo o fruto exceto a casca, estas apresentaram valores mais elevados, o que permitiu concluir também que as membranas carpelares apresentaram uma atividade antioxidante superior à polpa, e podem ter sido as responsáveis por estes valores mais elevados para essas amostras. Já nas amostras da casca e membranas carpelares, tendo em conta a ordem de grandeza do valor de atividade antioxidante, associa-se o valor obtido maioritariamente à casca.

Relativamente ao pH, conclui-se que é um bom indicativo para monitorizar o decorrer do processo fermentativo, mas neste estudo em concreto não é possível afirmar que tenha uma ligação à atividade antioxidante.

É importante destacar também que apesar da fruta, nos últimos ensaios já não estar em ótimas condições devido ao prolongado tempo que esteve armazenada no frigorífico, apresentou ainda resultados muito promissores. Este facto evidenciou o potencial dos resíduos da romã, em preservar os compostos com atividade antioxidante, mesmo com a deterioração da fruta. Este é um ponto muito positivo para as indústrias pois, apesar de se tratar de resíduos, é ainda possível a sua reutilização e aproveitamento de compostos para aplicação nos setores alimentar, farmacêutico e cosmético, contribuindo para uma economia circular e mais sustentável.

Os objetivos propostos para a realização deste estudo foram assim alcançados apesar das limitações que surgiram. A primeira limitação foi o tempo prolongado de obtenção de resposta por parte das indústrias e produtores para a obtenção dos resíduos de frutas necessários para

iniciar o estudo. Este atraso, assim como a longa duração dos ensaios de fermentação, acabaram por levar à diminuição do tempo disponível para a realização dos ensaios de avaliação da atividade antioxidante, onde só foi possível analisar as amostras do tempo inicial e final da fermentação, quando se previa analisar mais do que essas amostras para avaliação e comparação de resultados ao longo do tempo. Numa perspetiva futura seria interessante analisar mais amostras em diferentes tempos de fermentação de forma a analisar o perfil de evolução da atividade antioxidante de cada amostra e comparar com os resultados obtidos neste estudo. Seria também relevante realizar mais ensaios com a casca, tendo em conta os resultados promissores que foram obtidos, tentar analisar e quantificar os principais compostos que lhe conferem uma elevada atividade antioxidante, e tentar perceber o interesse e aplicabilidade que poderiam ter na área de dermocosmética como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos. Juntamente com estas propostas, seria também importante utilizar outras metodologias de avaliação da atividade antioxidante, baseadas em diferentes mecanismos, para verificar se o perfil de bioatividade se mantinha.

Referências Bibliográficas

- Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., & Sestili, P. (2015). Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry*, *174*, 417–425. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.11.035>
- Alexandre, E. M. C., Silva, S., Santos, S. A. O., Silvestre, A. J. D., Duarte, M. F., Saraiva, J. A., & Pintado, M. (2019). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. *Food Research International*, *115*, 167–176. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.08.044>
- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products*, *76*, 604–615. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.07.073>
- Campos, L., Seixas, L., Henriques, M. H. F., Peres, A. M., & Veloso, A. C. A. (2022). Pomegranate Peels and Seeds as a Source of Phenolic Compounds: Effect of Cultivar, By-Product, and Extraction Solvent. *International Journal of Food Science*, *2022*. <https://doi.org/10.1155/2022/9189575>
- Chan, L. P., Tseng, Y. P., Liu, C., & Liang, C. H. (2022). Fermented pomegranate extracts protect against oxidative stress and aging of skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *21(5)*, 2236–2245. <https://doi.org/10.1111/JOCD.14379>
- de Oliveira, S. D., de Souza, E. L., Araújo, C. M., Martins, A. C. S., Borges, G. da S. C., Lima, M. dos S., Viera, V. B., Garcia, E. F., da Conceição, M. L., de Souza, A. L., & de Oliveira, M. E. G. (2023). Spontaneous fermentation improves the physicochemical characteristics, bioactive compounds, and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) and guava (*Psidium guajava* L.) fruit processing by-products. *3 Biotech*, *13(9)*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/S13205-023-03738-1/FIGURES/2>
- Derakhshan, Z., Ferrante, M., Tadi, M., Ansari, F., Heydari, A., Hosseini, M. S., Conti, G. O., & Sadrabad, E. K. (2018). Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food and Chemical Toxicology*, *114*, 108–111. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018.02.023>
- Erskine, E., Ozkan, G., Lu, B., & Capanoglu, E. (2023). Effects of Fermentation Process on the Antioxidant Capacity of Fruit Byproducts. *ACS Omega*, *8(5)*, 4543–4553. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.2C07602>
- Fourati, M., Smaoui, S., Hlima, H. Ben, Elhadeif, K., Braïek, O. Ben, Ennouri, K., Mtibaa, A. C., & Mellouli, L. (2020). Bioactive Compounds and Pharmacological Potential of Pomegranate (*Punica*

- granatum) Seeds – A Review. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 75(4), 477–486. <https://doi.org/10.1007/S11130-020-00863-7>
- George, J., Edwards, D., Pun, S., & Williams, D. (2022). Evaluation of Antioxidant Capacity (ABTS and CUPRAC) and Total Phenolic Content (Folin–Ciocalteu) Assays of Selected Fruit, Vegetables, and Spices. *International Journal of Food Science*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2581470>
- Gulcin, i. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology* 2020 94:3, 94(3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/S00204-020-02689-3>
- Gullón, P., Astray, G., Gullón, B., Tomasevic, I., & Lorenzo, J. M. (2020). Pomegranate Peel as Suitable Source of High-Added Value Bioactives: Tailored Functionalized Meat Products. *Molecules*, 25(12). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25122859>
- Kandylis, P., & Kokkinomagoulos, E. (2020). Food Applications and Potential Health Benefits of Pomegranate and its Derivatives. *Foods* 2020, Vol. 9, Page 122, 9(2), 122. <https://doi.org/10.3390/FOODS9020122>
- Kaseke, T., Opara, U. L., & Fawole, O. A. (2021). Effects of enzymatic pretreatment of seeds on the physicochemical properties, bioactive compounds, and antioxidant activity of pomegranate seed oil. *Molecules*, 26(15). <https://doi.org/10.3390/molecules26154575>
- Khemakhem, M., Zarroug, Y., Jabou, K., Selmi, S., & Bouzouita, N. (2021). Physicochemical characterization of oil, antioxidant potential, and phenolic profile of seeds isolated from Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Journal of Food Science*, 86(3), 852–859. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15636>
- Lampakis, D., Skenderidis, P., Leontopoulos, S., Editors, A., Rodríguez Solana, R., Manuel Moreno-Rojas, J., & Pereira Caro, G. (2021). Technologies and Extraction Methods of Polyphenolic Compounds Derived from Pomegranate (*Punica granatum*) Peels. A Mini Review. *Processes* 2021, Vol. 9, Page 236, 9(2), 236. <https://doi.org/10.3390/PR9020236>
- Leitão, M., Ribeiro, T., García, P. A., Barreiros, L., & Correia, P. (2022). Benefits of Fermented Papaya in Human Health. *Foods*, 11(4), 563. <https://doi.org/10.3390/FOODS11040563>
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2012.11.051>
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 4132, 24(22), 4132. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24224132>

- Magalhães, L. M., Barreiros, L., Maia, M. A., Reis, S., & Segundo, M. A. (2012). Rapid assessment of endpoint antioxidant capacity of red wines through microchemical methods using a kinetic matching approach. *Talanta*, *97*, 473–483. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2012.05.002>
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, *613*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2008.02.047>
- Magangana, T. P., Makunga, N. P., Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2020). Processing Factors Affecting the Phytochemical and Nutritional Properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Waste: A Review. *Molecules*, *25*(20), 4690. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25204690>
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., & Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, *44*, 94–102. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2016.11.010>
- Miguel-Chávez, R. S., & Miguel-Chávez, R. S. (2017). Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. *Phenolic Compounds – Biological Activity*. <https://doi.org/10.5772/66897>
- Mo, Y., Ma, J., Gao, W., Zhang, L., Li, J., Li, J., & Zang, J. (2022). Pomegranate Peel as a Source of Bioactive Compounds: A Mini Review on Their Physiological Functions. *Frontiers in Nutrition*, *9*, 887113. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.887113>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021a). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(7). <https://doi.org/10.3390/IJMS22073380>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021b). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(7). <https://doi.org/10.3390/IJMS22073380>
- Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *30*(4), 652–664. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2010.11.016>
- Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *71*(46), 17543. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.3C04022>

- Rahaman, M. M., Hossain, R., Herrera-Bravo, J., Islam, M. T., Atolani, O., Adeyemi, O. S., Owolodun, O. A., Kambizi, L., Daştan, S. D., Calina, D., & Sharifi-Rad, J. (2023). Natural antioxidants from some fruits, seeds, foods, natural products, and associated health benefits: An update. *Food Science & Nutrition*, *11*(4), 1657. <https://doi.org/10.1002/FSN3.3217>
- Ronca, C. L., Marques, S. S., Ritieni, A., Giménez-Martínez, R., Barreiros, L., & Segundo, M. A. (2024). Olive Oil Waste as a Source of Functional Food Ingredients: Assessing Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in Olive Leaves. *Foods*, *13*(2). <https://doi.org/10.3390/foods13020189>
- Ruiz Rodríguez, L. G., Zamora Gasga, V. M., Pescuma, M., Van Nieuwenhove, C., Mozzi, F., & Sánchez Burgos, J. A. (2021). Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages. *Food Research International*, *140*, 109854. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109854>
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). *Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>
- Saud, S., Xiaojuan, T., & Fahad, S. (2024). The consequences of fermentation metabolism on the qualitative qualities and biological activity of fermented fruit and vegetable juices. *Food Chemistry: X*, *21*. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2024.101209>
- Septembre-Malaterre, A., Remize, F., & Poucheret, P. (2018). Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, *104*, 86–99. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.09.031>
- Siddeeg, A., AlKehayez, N. M., Abu-Hiamed, H. A., Al-Sanea, E. A., & AL-Farga, A. M. (2021a). Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(3), 1633. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.11.064>
- Siddeeg, A., AlKehayez, N. M., Abu-Hiamed, H. A., Al-Sanea, E. A., & AL-Farga, A. M. (2021b). Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(3), 1633. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.11.064>
- Trofin, A. E., Trincă, L. C., Ungureanu, E., & Ariton, A. M. (2019). CUPRAC Voltammetric Determination of Antioxidant Capacity in Tea Samples by Using Screen-Printed Microelectrodes. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, *2019*. <https://doi.org/10.1155/2019/8012758>

- Venkitasamy, C., Zhao, L., Zhang, R., & Pan, Z. (2019). Pomegranate. *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products*, 181–216. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814138-0.00008-3>
- Vučić, V., Grabež, M., Trchounian, A., & Arsić, A. (2019). Composition and Potential Health Benefits of Pomegranate: A Review. *Current Pharmaceutical Design*, 25(16), 1817–1827. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190708183941>
- Xiang, Q., Li, M., Wen, J., Ren, F., Yang, Z., Jiang, X., & Chen, Y. (2022). The bioactivity and applications of pomegranate peel extract: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 46(7), e14105. <https://doi.org/10.1111/JFBC.14105>
- Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13394. <https://doi.org/10.1111/JFBC.13394>

Anexos

Anexo 1. Exemplo do email enviado para as indústrias para obtenção de substratos de romã

Ex.mos(as) Senhores(as),

O meu nome é Beatriz dos Santos Dourado e sou estudante do Mestrado em Farmácia no ramo de Tecnologia do Medicamento e de Produtos de Saúde da Escola Superior de Saúde (ESS) do Instituto Politécnico do Porto (IPP). Atualmente encontro-me a terminar o ano curricular e estou a preparar o desenvolvimento de uma tese intitulada “Análise da atividade biológica de compostos bioativos provenientes da fermentação de excedentes de frutas”, orientada pela Professora Doutora Luísa Barreiros (Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto; LAQV, REQUIMTE, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto) e pela Professora Doutora Patrícia Correia (Centro de Investigação em Saúde e Ambiente, CISA, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto). O objetivo geral da investigação será a análise da atividade biológica de produtos resultantes da fermentação microbiana de excedentes de frutas, obtidas a partir de indústrias transformadoras de fruta, com especial interesse na romã/figo e nos seus possíveis excedentes. A partir desses excedentes, pretende-se produzir fermentados utilizando diferentes condições experimentais, adaptar e aplicar métodos analíticos de determinação de atividade antioxidante dos produtos fermentados, determinar a atividade antimicrobiana dos mesmos e fixar as condições operatórias mais eficientes para a produção fermentativa de metabolitos ativos.

Assim, venho por este meio solicitar a colaboração da (nome da indústria) com o meu projeto de investigação que terá início em setembro de 2023 e término previsto em junho de 2024. A necessidade desta parceria iria incidir na solicitação do fornecimento dos diferentes excedentes de romã que a (nome da indústria) obtém na sua atividade produtiva, para que seja possível ter substrato para desenvolver o meu projeto de investigação.

Estou disponível para qualquer esclarecimento ou informação adicional que julguem necessário.

Agradecendo desde já toda a atenção dispensada, e na expectativa de uma resposta positiva pela vossa parte, despeço-me, apresentando os meus melhores cumprimentos.

Beatriz Dourado

Estudante do Mestrado em Farmácia

ESS-IPP

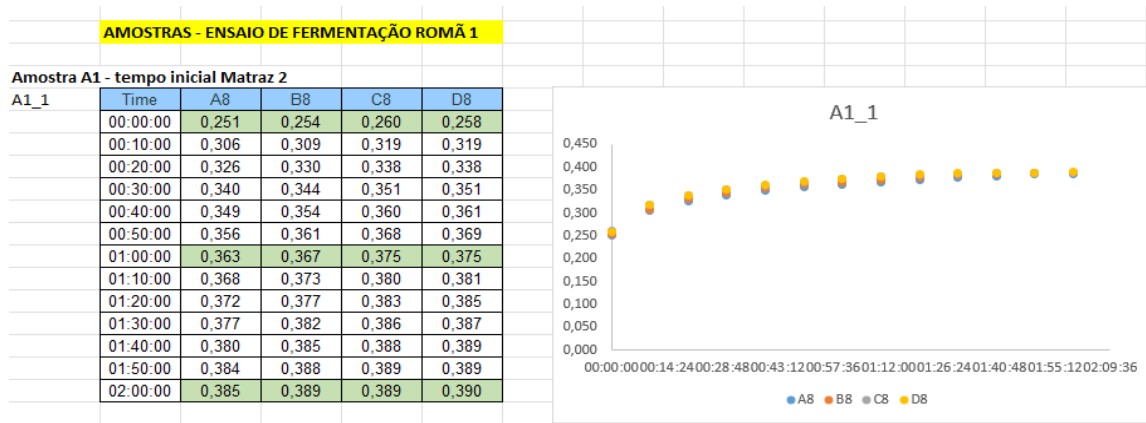
Anexo 2. Exemplo das tabelas de valores de pH do processo fermentativo dos ensaios 1, 2 e 3

	A	B	C	D	E
1	ENSAIO 1				
2					
3	Data da Leitura	Nº de horas de fermentação	Matraz 1	Matraz 2	
4	22/jan	0 h	4,291	4,321	
5	24/jan	46,5 h	4,333	4,397	
6	26/jan	92,5 h	3,879	3,752	
7	29/jan	159,5 h	3,865	3,782	
8	30/jan	189 h	4,055	3,935	
9	31/jan	211 h	3,999	3,834	
10	01/fev	234 h	4,009	3,885	
11	02/fev	258,5 h	3,843	3,717	
12	05/fev	332 h	4,179	3,940	
13	07/fev	381 h	3,716	3,458	
14	09/fev	425,5 h	3,763	3,477	

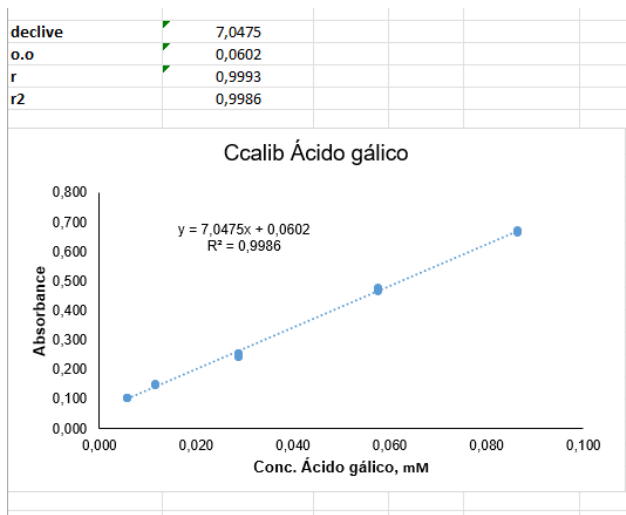
	A	B	C	D
1	ENSAIO 2			
2				
3	Data da Leitura	Nº de horas de fermentação	Matraz 1	Matraz 2
4	19/fev	0 h	4,217	4,246
5	21/fev	45 h	4,259	4,314
6	23/fev	93,6 h	4,208	3,987
7	26/fev	165,6 h	3,817	4,106
8	27/fev	189,6 h	3,878	4,224
9	28/fev	213,6 h	3,869	4,289
10	01/mar	258,3 h	3,832	4,530
11	04/mar	333,3 h	3,580	4,679
12	05/mar	358,3 h	3,442	4,656
13	07/mar	406,3 h	3,278	4,134
14	08/mar	432,9 h	3,344	3,899
15	11/mar	498 h	3,328	3,586
16	13/mar	551,9 h	3,250	3,435
17	15/mar	598,9 h	3,473	3,394
18	18/mar	669,3 h	4,203	3,300

	A	B	C	D	E	F
1	ENSAIO 3					
2						
3	Data da Leitura	Nº de horas de fermentação	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Matraz 4
4	25/mar	0 h	4,428	4,448	3,801	3,819
5	28/mar	66,6 h	3,251	3,354	3,468	3,331
6	02/abr	186,3 h	3,103	3,146	3,280	3,304
7	05/abr	258 h	3,214	3,189	3,216	3,233
8	08/abr	329,3 h	3,555	3,214	3,181	3,248
9	09/abr	360 h	3,660	3,229	3,189	3,250
10	11/abr	401,9 h	3,513	3,300	3,203	3,279

Anexo 3. Exemplo do processamento de dados realizados em Excel para o método Folin Ciocalteu

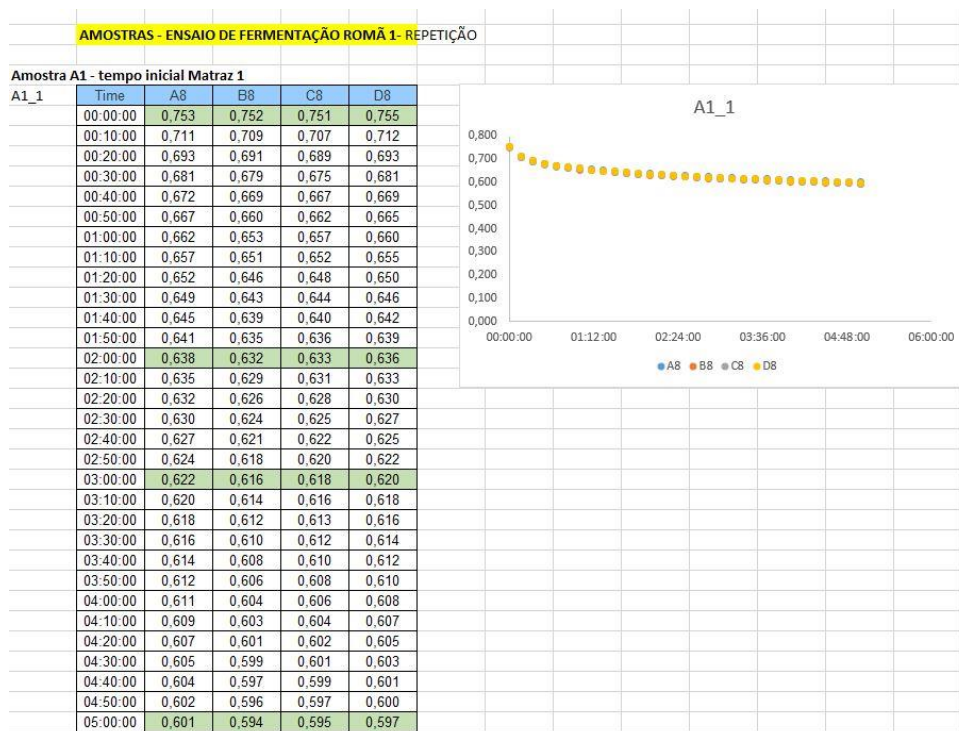


Massa (Ácido gálico)	4	mg		
[Ácido gálico] =	1,152	mM	Água	
[Ácido gálico]int =	0,1152	mM	Água	
Ácido gálico (mM)	Abs	Média	DP	%DPR
0	0,057	0,059	0,001	2,40
0	0,059			
0	0,060			
0	0,060			
0,006	0,102	0,103	0,001	0,93
0,006	0,103			
0,006	0,104			
0,006	0,104			
0,012	0,146	0,148	0,003	1,79
0,012				
0,012	0,147			
0,012	0,151			
0,029	0,245	0,251	0,008	3,01
0,029	0,243			
0,029	0,257			
0,029	0,257			
0,058	0,467	0,472	0,004	0,86
0,058	0,472			
0,058	0,472			
0,058	0,477			
0,086	0,667	0,669	0,004	0,64
0,086	0,664			
0,086	0,674			
0,086	0,670			



Amostra A1 - tempo inicial Matraz 2											Branco da amostra - A1			
	Massa (g)	FD	Abs	Eq Ác. Gálico (mmol L ⁻¹)	Eq Ác. Gálico (µmol L ⁻¹)	Eq Ác. Gálico (µmol g ⁻¹)	Media	dp	dpr	Media	dp	dpr		
A1_1	91,8904	200	0,385	9,2168	9216,8	10,03	10,13	0,07	0,7	9,80	0,40	4		0,054
			0,389	9,3303	9330,3	10,15							0,057	
			0,389	9,3303	9330,3	10,15							0,067	
			0,390	9,3587	9358,7	10,18							0,054	
A1_2	91,8904	500	0,185	8,8526	8852,6	9,63	9,81	0,20	2,1					
			0,191	9,2782	9278,2	10,10								
			0,187	8,9944	8994,4	9,79								
A1_3	91,8904	1000	0,186	8,9235	8923,5	9,71	9,46	0,48	5,1					
			0,120	8,4820	8482,0	9,23								
			0,118	8,1982	8198,2	8,92								
			0,125	9,1915	9191,5	10,00								
			0,123	8,9077	8907,7	9,69								

Anexo 5. Exemplo do processamento de dados realizados em Excel para o método ABTS



Massa (Trolox) =	1,8	mg					
[Trolox] =	0,705	mM					10% etanol
[Trolox] =	0,0705	mM					10% etanol
ABTS							
Absorvância (Abs)				Variação Absorvância			
0 min	120 min	180 min	300 min	Trolox (mM)	120 min	180 min	300 min
0,852	0,827	0,822	0,816	0,007	0,066	0,067	0,066
0,847	0,828	0,824	0,818	0,007	0,065	0,065	0,064
0,853	0,831	0,827	0,820	0,007	0,062	0,062	0,062
0,851	0,827	0,822	0,815	0,007	0,066	0,067	0,067
0,786	0,764	0,759	0,753	0,014	0,129	0,130	0,129
0,773	0,752	0,749	0,743	0,014	0,141	0,140	0,139
0,773	0,758	0,755	0,750	0,014	0,135	0,134	0,132
0,769	0,756	0,754	0,748	0,014	0,137	0,135	0,134
0,689	0,661	0,657	0,653	0,023	0,232	0,232	0,229
0,679	0,656	0,652	0,648	0,023	0,237	0,237	0,234
0,677	0,657	0,654	0,650	0,023	0,236	0,235	0,232
0,668	0,656	0,654	0,650	0,023	0,237	0,235	0,232
0,570	0,547	0,545	0,541	0,035	0,346	0,344	0,341
0,540	0,529	0,527	0,525	0,035	0,364	0,362	0,357
0,544	0,526	0,524	0,520	0,035	0,367	0,365	0,362
0,550	0,538	0,537	0,534	0,035	0,355	0,352	0,348
0,353	0,344	0,342	0,341	0,053	0,549	0,547	0,541
0,352	0,340	0,339	0,338	0,053	0,553	0,550	0,544
0,353	0,343	0,342	0,340	0,053	0,550	0,547	0,542
0,351	0,338	0,337	0,335	0,053	0,555	0,552	0,547

