

JULIANA APARECIDA DOS SANTOS

**RADIAÇÃO GAMA EM ROMÃ: COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, EXTRAÇÃO E
BIOSSÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS**

Botucatu

2021

JULIANA APARECIDA DOS SANTOS

**RADIAÇÃO GAMA EM ROMÃ: COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, EXTRAÇÃO E
BIOSSÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia - Horticultura.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Lopes Vieites

Botucatu

2021

S237r Santos, Juliana Aparecida dos
Radiação gama em romã : composição nutricional, extração e
biossíntese de compostos bioativos / Juliana Aparecida dos Santos. --
Botucatu, 2021
104 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientador: Rogério Lopes Vieites

1. Tecnologia pós-colheita. 2. Irradiação. 3. Metabolismo
secundário. 4. Antioxidantes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: RADIAÇÃO GAMA EM ROMÃ: COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, EXTRAÇÃO E BIOSÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS

AUTORA: JULIANA APARECIDA DOS SANTOS

ORIENTADOR: ROGÉRIO LOPES VIEITES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ROGÉRIO LOPES VIEITES (Participação Virtual)
Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu UNESP

Prof. Dr. ANDRÉ JOSÉ DE CAMPOS (Participação Virtual)
Engenharia Agrícola / Universidade Estadual de Goiás - UEG

Profa. Dra. ANGELA VACARO DE SOUZA (Participação Virtual)
Engenharia de Biosistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia/Unesp Tupã

Dr.ª ELISANGELA MARQUES JERONIMO TORRES (Participação Virtual)
. / APTA - Polo Regional Centro Oeste - Bauru

Profa. Dra. MARTA HELENA FILLET SPOTO (Participação Virtual)
Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz do
Câmpus de Piracicaba da USP

Botucatu, 03 de dezembro de 2021

Aos meus pais,
Regina e Antônio,
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus irmãos Sandra, Luzia e Donizete e sobrinhos Arthur, Lucas, Heitor e João Pedro. Ao Marco pelo companheirismo. À amiga e técnica de laboratório, Márcia. Aos amigos Andres e Vander por todas as formas de ajuda.

Ao Prof. Dr. Rogério, pela orientação, ensinamentos e amizade.

Ao Dr. Narita da Apta Presidente Prudente-SP, por possibilitar a aquisição dos frutos.

Ao Centro de Tecnologia das Radiações – CTR IPEN/CNEN – SP, por irradiar os frutos.

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio a pesquisa.

RESUMO

O consumo de frutas *in natura* como a romã e seus derivados, fonte de compostos bioativos, tem sido associado a diferentes benefícios a saúde. O perfil bioativo é influenciado pelo cultivar, clima, maturidade, práticas de cultivo e condições de armazenamento. As tecnologias como a radiação gama podem ser utilizadas para melhorar a conservação e aumentar a vida útil em pós-colheita de frutas, podendo também ativar seu sistema de defesa, induzindo o estresse oxidativo, que envolve a síntese de metabólitos secundários antioxidantes. Neste contexto, objetivou-se com o presente trabalho adequar os protocolos de extração de compostos bioativos; caracterizar a romã 'Comum' e avaliar a influência da radiação gama no metabolismo primário e secundário. Os frutos foram irradiados no Centro de Tecnologia das Radiações - CTR - do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN - USP/Campus de São Paulo, com cobalto-60 (0,0 kGy; 0,3 kGy; 0,6 kGy; 0,9 kGy; 1,2 kGy e 1,5 kGy). Foram armazenados no Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP em câmara fria com temperatura de $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e $90 \pm 5\%$ de UR, durante 30 dias. Foram realizadas análises físico-químicas e bioquímicas dos frutos a cada 5 dias. Um único solvente não foi capaz de extrair os compostos bioativos das amostras de polpa e casca de romã 'Comum'. A irradiação na dose 1,5 KGy associada a refrigeração reduziu a perda de massa dos frutos. O uso da irradiação não alterou a firmeza dos frutos, o ângulo de cor Hue da casca e a acidez titulável da polpa. Foi verificado para todas as doses de radiação gama e para a testemunha que a refrigeração foi efetiva na perda de massa. A irradiação foi eficiente na síntese de compostos bioativos. As doses de radiação gama 0,3 kGy e 0,6 kGy aumentaram o conteúdo de antocianina monomérica total da polpa da romã 'Comum' ao longo do armazenamento. A radiação gama na dose 0,6 kGy aumentou a atividade antioxidante da casca. A dose de 1,5 kGy promoveu aumento no conteúdo de compostos fenólicos totais e manteve a atividade antioxidante da polpa da romã ao final do armazenamento.

Palavras-chave: *Punica granatum* L.; cv. Comum; cobalto 60; metabolismo secundário; atividade antioxidante.

ABSTRACT

The consumption of fresh fruits such as pomegranate and its derivatives, a source of bioactive compounds, has been associated with different health benefits. The bioactive profile is influenced by cultivar, climate, maturity, cultivation practices and storage conditions. Technologies such as gamma radiation can be used to improve conservation and increase post-harvest shelf life of fruits, and can also activate their defense system, inducing oxidative stress, which involves the synthesis of secondary antioxidant metabolites. In this context, the objective of the present work was to adapt the protocols for the extraction of bioactive compounds; characterize the 'Comum' pomegranate and evaluate the influence of gamma radiation on primary and secondary metabolism. The 'Comum' pomegranate fruits were irradiated at the Radiation Technology Center - CTR - of the Energy and Nuclear Research Institute - IPEN - USP/São Paulo Campus, with cobalt-60 (0.0 kGy; 0.3 kGy; 0.6 kGy; 0.9 kGy; 1.2 kGy and 1.5 kGy). They were stored in the Vegetal Production Department of FCA/UNESP in a cold chamber with a temperature of $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and $90 \pm 5\%$ RH for 30 days. Physical-chemical and biochemical analyzes of the fruits were performed every 5 days. A single solvent was not able to extract the bioactive compounds from the pulp and peel samples of the 'Comum' pomegranate. Irradiation at a dose of 1.5 KGy associated with refrigeration reduced fruit mass loss. The use of irradiation did not change the firmness of the fruits, the Hue color angle of the peel and the titratable acidity of the pulp. It was verified for all doses of gamma radiation and for the control that the refrigeration was effective in the loss of mass. Irradiation was efficient in the synthesis of bioactive compounds. Gamma radiation doses of 0.3 kGy and 0.6 kGy increased the total monomeric anthocyanin content of 'Comum' pomegranate pulp during storage. Gamma radiation at a dose of 0.6 kGy increased the antioxidant activity of the peel. The dose of 1.5 kGy increased the content of total phenolic compounds and maintained the antioxidant activity of the pomegranate pulp at the end of storage.

Keywords: *Punica granatum* L.; cv. Comum; cobalt 60; secondary metabolism; antioxidant activity.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 - RADIAÇÃO GAMA NA CONSERVAÇÃO REFRIGERADA DA ROMÃ ‘COMUM’

Tabela 1 - Composição mineral da casca e polpa da romã ‘Comum’ no dia zero de armazenamento, sem irradiação.....	54
Tabela 2 - Caracterização da romã ‘Comum’ no dia da colheita para a composição centesimal de Umidade, Cinzas, Lipídeos, Proteína bruta, Fibras, Açúcar redutor e Valor Calórico Total (VCT).....	55
Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) das variáveis com significância das doses de irradiação, dias e a interação destes fatores.....	56

Capítulo 3 – RADIAÇÃO GAMA NA BIOSÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA ROMÃ ‘COMUM’

Tabela 1 - Análise de variância (ANOVA) das variáveis com significância das doses de irradiação, dias e a interação destes fatores.....	86
---	----

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL.....	17
	CAPÍTULO 1 – EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	
	DA POLPA E CASCA DA ROMÃ ‘COMUM’.....	24
1.1	INTRODUÇÃO.....	26
1.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1.2.1	Material Vegetal.....	27
1.2.2	Extração.....	29
1.2.2.1	Solvente de extração para flavonoides totais, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante	29
1.2.2.2	Concentração de solvente para flavonoides totais, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.....	30
1.2.2.3	Acidez do solvente para compostos fenólicos	30
1.2.3	Determinação de flavonoides totais.....	30
1.2.4	Determinação de Compostos Fenólicos Totais.....	31
1.2.5	Atividade Antioxidante pelo método DPPH	31
1.2.6	Delineamento experimental e análise estatística.....	31
1.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
1.3.1	Compostos fenólicos totais.....	32
1.3.2	Flavonoides totais.....	35
1.3.3	Atividade antioxidante.....	36
1.4	CONCLUSÕES.....	37
	REFERÊNCIAS.....	39
	CAPÍTULO 2 - RADIAÇÃO GAMA NA CONSERVAÇÃO	
	REFRIGERADA DA ROMÃ ‘COMUM’.....	42
2.1	INTRODUÇÃO.....	44
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.2.1	Material Vegetal.....	46
2.2.2	Irradiação dos frutos.....	47
2.2.3	Preparo das amostras de polpa e casca de romã.....	48
2.2.4	Variáveis analisadas.....	48
2.2.4.1	Caracterização centesimal dos frutos.....	48
2.2.4.1.1	Umidade	49
2.2.4.1.2	Cinzas	49
2.2.4.1.3	Fibra Bruta	49
2.2.4.1.4	Lipídeos	50
2.2.4.1.5	Proteína bruta	50
2.2.4.1.6	Valor calórico total.....	50
2.2.4.2	Grupo não destrutivo.....	50
2.2.4.2.1	Perda de Massa.....	50
2.2.4.2.2	Taxa de Respiração	51
2.2.4.3	Grupo Destrutivo	51
2.2.4.3.1	Análise mineral dos frutos.....	51
2.2.4.3.2	Firmeza dos frutos.....	51

2.2.4.3.3	Determinação da Cor instrumental para polpa e casca.....	52
2.2.4.3.4	Sólidos solúveis	52
2.2.4.3.5	Acidez titulável.....	52
2.2.4.3.6	Índice de maturação (Ratio).....	52
2.2.4.3.7	Potencial hidrogeniônico (pH).....	53
2.2.4.3.8	Açúcares redutores	53
2.2.4.4	Incidência de doenças.....	53
2.2.5	Delineamento experimental e análise estatística.....	53
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
2.4	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	CAPÍTULO 3 - RADIAÇÃO GAMA NA BIOSSÍNTESE DE	
	COMPOSTOS BIOATIVOS DA ROMÃ ‘COMUM’	76
3.1	INTRODUÇÃO.....	78
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	80
3.2.1	Material Vegetal.....	80
3.2.2	Irradiação dos frutos	81
3.2.3	Preparo das amostras de polpa e casca de romã	81
3.2.4	Variáveis analisadas	82
3.2.4.1	Preparo dos Extratos.....	82
3.2.4.2	Determinação de Compostos Fenólicos Totais (CFT).....	83
3.2.4.3	Determinação de flavonoides totais (FT).....	83
3.2.4.4	Atividade Antioxidante pelo método DPPH (AA).....	83
3.2.5.5	Poder redutor férrico (FRAP)	84
3.2.5.6	Antocianina monomérica da polpa	84
3.2.6	Delineamento experimental e análise estatística.....	85
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
3.3.1	Compostos Fenólicos Totais.....	86
3.3.2	Flavonoides totais.....	89
3.3.3	Atividade Antioxidante por DPPH e FRAP.....	90
3.3.4	Antocianina monomérica total.....	94
	CONCLUSÕES.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
	REFERÊNCIAS.....	101

INTRODUÇÃO GERAL

A romã (*Punica granatum* L.) pertencente à família Lythraceae (GRAHAM et al. 2005). O gênero *Punica* inclui duas espécies, *P. granatum* L. e *P. protopunica* Balf. A romã foi inicialmente denominada *Malum punicum*, que significa a maçã de Cartago. Linneaus chamou *Punica granatum*, sendo que *granatum* significa “cheia de semente”. O nome *Punica* vem de Cartago, um nome romano feminizado e é uma cidade antiga na Tunísia (KAHRAMANOGLU; USANMAZ, 2016). De acordo com Chandra et al. (2010) a romã é uma das frutas ancestrais associadas a várias culturas humanas no mundo, sendo que existem menções à romã na Bíblia, no Alcorão, nas artes budistas e chinesas.

A romã também denominada romeira, granada, milagreira é originária provavelmente da Ásia, cultivada em quase todo o mundo, inclusive no Brasil (LORENZI; MATOS, 2008). Seu cultivo se estendeu para o resto dos países da região do Mediterrâneo, Índia, China e os espanhóis levaram para a América (MORENO, 2010). Sua adaptação às mais variadas condições climáticas reflete na ampla distribuição geográfica global (TEIXEIRA da SILVA et al., 2013), sendo uma fruta tropical e subtropical (PAREEK et al., 2015).

Existem muitos cultivares diferentes de romã espalhados pelo mundo (KANDYLIS; KOKKINOMAGOULOS, 2020). Pareek et al. (2015) relataram que existem mais de 500 cultivares de romã, sendo a ‘Wonderful’ a principal cultivar em todo o mundo e de acordo com Ferreira (2017) no mercado nacional as principais cultivares encontradas são a Wonderful, Rubi e Comum. Segundo Suzuki (2016) a romã ‘Comum’ produz frutos graúdos durante todo o ano, diferente de outros cultivares produzidas fora do Brasil, e possui casca de coloração amarelada e polpa róseo clara.

A romã ‘Comum’ pode ser encontrada na Ceagesp, com pico na comercialização em dezembro e janeiro, devido às festividades e superstições inerentes a estas épocas, bem como nos meses de agosto e setembro, referentes ao ano novo judaico. Nos meses de junho a setembro há os melhores preços e entre os meses de novembro a janeiro ocorre maior oferta de romã (SUZUKI, 2016).

Segundo dados fornecidos pelo Ceagesp, nos meses de junho, julho, novembro e dezembro de 2019, foram comercializados em média 24.665 kg, 22.345

kg, 187.630 kg e 309.600 kg de romã, com preço médio de R\$11,63, R\$12,55, R\$10,41 e R\$9,19 por quilograma de romã, respectivamente. No ano de 2020 foram comercializados nos meses de junho e julho, 15.050 kg e 21.140 kg de romã, com preço médio de R\$17,98 e R\$15,09 por quilograma de romã, respectivamente. Em janeiro, fevereiro e março de 2021, foram comercializados em média 39.995 kg, 63.435 kg e 62.275 kg de romã com preço médio de R\$ 13,59, R\$ 9,84 e R\$ 10,24 por quilograma, respectivamente. Já nos meses de junho, julho e agosto de 2021, foram comercializados em média 7.225 kg, 16.565 kg e 12.020 kg pelo preço médio de R\$ 11,32, R\$ 16,07 e R\$ 17,82 por quilograma, respectivamente.

A demanda pelo fruto da romãzeira vem se expandido por parte das indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticos e tem também despertado o interesse de produtores e comerciantes para comercialização do fruto na forma *in natura* (MOREIRA, 2014) e seu uso como ornamental (PAREEK et al., 2015).

O fruto de romã é denominado balausta, possui pericarpo seco, coriáceo, com numerosas sementes (DAMIÃO FILHO, 1993). As sementes são a parte comestível do fruto e são formadas por uma parte interna dura, que contém os cotilédones e o embrião, e uma membrana polpuda da qual é extraído o suco, a testa (MELGAREJO-SÁNCHEZ et al., 2021). A semente da romã pode ser definida como uma estrutura reprodutiva que possui uma testa externa, carnuda ou polpuda, chamada sarcotesta e uma testa esclerotizada interna chamada mesotesta (MELGAREJO et al., 2020).

A romã é um fruto não climatérico (SHULMAN et al., 1984) e deve ser colhido com maturidade adequada (KUMAR et al., 2018), já que não amadurecem após a colheita (KAHRAMANOĞLU; USANMAZ, 2016). De acordo com Moreira et al. (2015), o manuseio correto da romã, associado a tecnologias que reduzem a sua deterioração, possibilita sua comercialização *in natura* em mercados mais distantes, uma vez que reduz a perda dos atributos de qualidade visual, físico-químicos e nutricionais.

De acordo com Pareek et al. (2015) a romã tem grande importância do ponto de vista da saúde, sendo explorada pelo valor nutricional de sua fruta e pelas propriedades medicinais atribuídas à diferentes partes da árvore. Segundo Pott et al. (2019) o sabor e as características nutricionais são atributos essenciais de qualidade e um dos principais fatores que influenciam a preferência do consumidor por uma fruta.

As frutas, em geral, desempenham um papel importante na manutenção de uma alimentação balanceada, fornecendo macro e micronutrientes, bem como compostos bioativos que promovem a saúde (KANDYLIS; KOKKINOMAGOULOS, 2020).

A romã é constituída por compostos químicos que resultam de seu metabolismo, seja primário ou secundário, recebendo o nome de metabólitos (CORONADO-REYES et al., 2020).

De acordo com seu papel no metabolismo vegetal, os metabólitos primários estão voltados para o crescimento e desenvolvimento, como carboidratos, aminoácidos, proteínas e lipídios (CROTEAU et al., 2000), sendo o metabolismo primário um componente importante para a qualidade da fruta (BEAUVOIT et al., 2018).

As sementes e a casca da romã possuem propriedades de grande interesse para a dieta e são úteis na prevenção de doenças. As sementes são ricas em água, açúcares, fibra bruta, ácidos graxos poliinsaturados, vitamina C, potássio e possuem baixo teor de sódio e calorias (MORENO, 2010).

Os metabólitos secundários sintetizados pelos vegetais possuem funções ecológicas importantes (TAIZ; ZEIGER, 2013), fornecem à própria planta estratégias de sobrevivência ou adaptativas (YAHIA, 2019), com papel vital na defesa da planta. Três classes principais de metabólitos secundários são produzidos pelas plantas, os terpenóides, os compostos fenólicos e os compostos contendo nitrogênio (POTT et al., 2019).

Segundo Jamwal et al. (2018) esses metabólitos também geram benefícios para a saúde e de acordo com Yahia (2019) os metabólitos secundários são responsáveis pelos produtos químicos bioativos com ações medicinais em humanos.

O corpo humano tem múltiplos mecanismos, especialmente sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para proteger as moléculas celulares dos danos induzidos pelas espécies reativas do oxigênio, no entanto a defesa endógena pode não ser suficiente para o estresse oxidativo, desta forma quantidades de antioxidantes exógenos são constantemente necessárias para manter um nível adequado de antioxidantes no corpo humano (KAR et al., 2011).

De la Rosa et al. (2019) relataram que estudos epidemiológicos têm mostrado uma correlação inversa entre um alto consumo de frutas e hortaliças e a incidência

de doenças crônicas não transmissíveis, devido à presença de diferentes fitoquímicos antioxidantes, como os compostos fenólicos.

O consumo regular de frutos de romã, suco ou mesmo seus compostos adicionados em outros produtos alimentícios atua de forma benéfica para a saúde, podendo proteger ou melhorar o curso de diversas doenças como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e até alguns tipos de câncer (KANDYLIS; KOKKINOMAGOULOS, 2020).

Existem mais de 8.000 compostos fenólicos, sendo estes classificados em dois grupos principais, os flavonoides e não flavonoides, sendo os flavonoides os mais bioativos (DE LA ROSA et al., 2019). Russo et al. (2018) relataram que a romã é uma importante fonte de compostos fenólicos devido à sua presença em diferentes partes da fruta.

Segundo Borguini et al. (2014) o fruto de romã apresenta alta concentração de compostos fenólicos, que apresentam atividades antimicrobiana e antioxidante.

A casca do fruto tem ação adstringente, antimicrobiana e antiviral. Em geral, é indicado para o tratamento de dores de garganta, rouquidão, inflamação da boca, e locais infectados pelo Herpes (BEZERRA et al., 2016).

De acordo com Caruso et al. (2020) o principal fator responsável pela atividade antioxidante da romã é a presença de polifenóis, sendo que o extrato da casca é o mais rico, o que o torna adequado como fonte natural de anti-radicais livres.

Os preparos obtidos a partir das flores, frutos e da casca da romãzeira são popularmente usados para tratar vários problemas de saúde. As antocianinas do fruto possuem elevada atividade antioxidante, maior do que a vitamina E (α -tocopherol), vitamina C (ácido ascórbico) e β -caroteno. O suco da romã possui atividade antioxidante três vezes maior do que o chá verde ou vinho vermelho, sendo usado contra úlceras, dores de ouvido, disenteria e lepra (JADON et al., 2012).

A romã exibe propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativas e antitumorigênicas por meio da modulação de múltiplas vias de sinalização, o que sugere seu uso como um agente quimiopreventivo ou quimioterápico promissor (SHARMA et al., 2017).

De acordo com Morzelle et al. (2019) a acetilcolinesterase é enzima-chave envolvida no progresso da doença de Alzheimer, e os extratos obtidos da casca da romã apresentaram conteúdo fenólico com potencial inibidor de acetilcolinesterase.

A romã está amplamente distribuída ao redor do mundo, portanto apresenta uma ampla diversidade genética, resultando em diferenças em sua composição fitoquímica (MELGAREJO-SÁNCHEZ et al., 2021). O perfil bioativo é influenciado pelo cultivar, região de cultivo, clima, maturidade, práticas de cultivo e condições de armazenamento (FERNANDES et al. 2017).

Segundo De la Rosa et al. (2019) durante o manuseio pós-colheita, os ferimentos, a temperatura, a atmosfera modificada, a irradiação e os tratamentos eliciadores são conhecidos por serem utilizados para regular o conteúdo de compostos fenólicos em frutas e hortaliças, já que induzem o estresse oxidativo, formando espécies reativas de oxigênio (ROS), ativando o sistema de defesa da planta, que envolve a síntese de metabólitos secundários antioxidantes, como os compostos fenólicos e a ativação de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) e ascorbato peroxidase (APX).

A irradiação é uma tecnologia pós-colheita que auxilia na vida útil dos produtos (DE LA ROSA et al., 2019), sendo utilizado comercialmente para diversas frutas como tratamento fitossanitário, altamente eficaz, podendo causar a esterilização ou morte dos organismos alvo, como microrganismos e pragas que infestam os alimentos (JAIN et al., 2017). Segundo Nunes (2015) o emprego da irradiação parece contribuir também como estímulo do metabolismo secundário das plantas, e consequentemente proporcionando aumento no teor de compostos com função antioxidante.

A irradiação de frutos consiste em submetê-los, já embalados ou a granel, a uma quantidade controlada de energia ionizante, por um tempo prefixado, com objetivos determinados (VIEITES, 2009), sendo que o alimento não entra em contato com o material radiativo (MASTRO, 2015). Segundo Vieites (2009) os produtos irradiados podem ser transportados, armazenados ou consumidos imediatamente após o tratamento, já que não possuem resíduos, diferentemente dos tratamentos químicos.

Durante o processo de irradiação não há aumento significativo da temperatura, por esse motivo é possível sua aplicação em produtos sensíveis à temperatura como é o caso de frutas frescas (MASTRO, 2015).

Os raios gama, feixe de elétrons e raios-X são fontes de radiação ionizante usadas comercialmente para preservar produtos frescos. Os raios gama emitidos pelos isótopos cobalto-60 (1,17 e 1,33 MeV) e césio-137 (0,66 MeV) são legalmente permitidos e, embora ambos sejam aceitos comercialmente, o cobalto-60 é usado principalmente devido à sua capacidade de penetração profunda (JEONG; JEONG, 2018), apresentar-se na forma metálica e ser insolúvel em água, proporcionando maior segurança ambiental (SILVA; ROZA, 2010). De acordo com De La Rosa et al. (2019), foi descrito que baixas doses dessas fontes de irradiação em frutas e hortaliças podem aumentar o conteúdo de compostos fenólicos, por um fenômeno conhecido como hormesis (doses baixas mostram um efeito benéfico, enquanto doses altas mostram um efeito prejudicial).

O fator mais importante no processo de irradiação é a dose ou energia absorvida pelo produto, que é dependente do tempo de exposição. A unidade de medida da dose de radiação no Sistema de Unidades Internacional é o Gray (Gy), que corresponde a uma energia absorvida de um joule por quilograma de produto ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1}$) (MASTRO, 2015).

A radurização é um processo de irradiação em alimentos que consiste em aplicação de doses baixas (menores que 1 kGy), objetivando inibir brotamento, retardar o início da senescência e deterioração microbiana de frutas e hortaliças, e controle de infestação por insetos e ácaros. A radicação é a aplicação de doses médias (entre 1 e 10 kGy), sendo ideal para pasteurizar sucos, retardar a deterioração de carnes frescas, controle de *Salmonella* em produtos avícolas, entre outros. Já a radapertização é a aplicação de doses altas (entre 10 kGy e 45 kGy) para a esterilização de carnes e outros produtos processados, destruindo populações de microrganismos que promovem deterioração dos alimentos (DIONÍSIO et al., 2009; MASTRO, 2015).

Pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária qualquer alimento poderá ser tratado por radiação desde que a dose mínima absorvida seja suficiente para alcançar a finalidade pretendida e a dose máxima absorvida seja inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e ou os atributos sensoriais do alimento (ANVISA, 2001).

O presente trabalho teve por objetivos: adequar os protocolos de extração de compostos bioativos para polpa e casca de romã 'Comum'; caracterizar a romã

‘Comum’ e avaliar a influência de radiação gama no metabolismo primário; avaliar a influência da utilização da radiação gama no metabolismo secundário da romã ‘Comum’.

CAPÍTULO 1

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA POLPA E CASCA DA ROMÃ 'COMUM'

RESUMO

A otimização da extração de compostos bioativos da polpa (sarcotesta) e da casca da romã 'Comum', pode gerar conhecimento sobre sua composição e servir como incentivo ao consumo dos frutos desta cultivar como fonte de compostos benéficos à saúde, e obtenção de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. Desta forma objetivou-se realizar a adequação de protocolos de extração para determinação de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e capacidade antioxidante (AA) da polpa e casca da romã 'Comum'. Os frutos foram colhidos no estádio de maturação comercial, no município de Alvares Machado/SP. No laboratório de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP de Botucatu/SP, foi feita a separação das sementes e da casca de forma manual em ambiente sem luz. A polpa (sarcotesta) foi extraída pela pressão realizada com auxílio de um rolo de massa sobre as sementes. Os parâmetros: solvente de extração, concentração de solvente e acidez do solvente de extração foram avaliados. Foi utilizado DIC de fator único para determinar as condições ideais para a extração de CFT, FT e AA (DPPH) para polpa e casca de frutos de romã. Diferenças significativas foram determinadas por análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Um único solvente não foi capaz de extrair os compostos bioativos das amostras de polpa e casca de romã 'Comum'. Para extração de compostos fenólicos totais da polpa de romã 'Comum' as melhores condições de extração foram a acetona 20% acidificada com HCl a 0,1N e para a casca as melhores condições de extração foram o metanol 40% sem acidificação. O melhor solvente de extração para flavonoides totais para polpa foi a água. Para a polpa da romã 'Comum' as melhores condições para determinação da atividade antioxidante foram o etanol 60 e 80% e para a casca o metanol 20%.

Palavras-chave: *Punica granatum* L.; compostos fenólicos; atividade antioxidante; extratores; solvente de extração.

ABSTRACT

The optimization of the extraction of bioactive compounds from the pulp (sarcotesta) and the peel of the 'Comum' pomegranate, can generate knowledge about its composition and serve as an incentive to consume the fruits of this cultivar as a source of beneficial compounds to health, and obtain food products, pharmaceuticals and cosmetics. Thus, the objective was to carry out the adequacy of extraction protocols for the determination of total phenolic compounds (CFT), total flavonoids (TF) and antioxidant capacity (AA) of the pulp and peel of the 'Comum' pomegranate. The 'Comum' pomegranate fruits were harvested at the commercial maturity stage, in the municipality of Alvares Machado/SP. In the Fruit and Vegetable Post-Harvest Laboratory of the Vegetable Production Department of the FCA/UNESP in Botucatu/SP, the seeds and husks were manually separated in a dark environment. The pulp (sarcotesta) was extracted by pressure using a rolling pin on the seeds. The parameters: extraction solvent, solvent concentration and extraction solvent acidity were evaluated. Single factor DIC was used to determine the optimal conditions for the extraction of CFT, FT and AA (DPPH) from pomegranate fruit pulp and peel. Significant differences were determined by analysis of variance (ANOVA) using Tukey's test ($p < 0.05$). A single solvent was not able to extract the bioactive compounds from the pulp and peel samples of the 'Comum' pomegranate. For the extraction of total phenolic compounds from 'Comum' pomegranate pulp, the best extraction conditions were 20% acetone acidified with 0.1N HCl and for the skin, the best extraction conditions were 40% methanol without acidification. The best extraction solvent for total flavonoids for pulp was water. For 'Comum' pomegranate pulp, the best conditions for determining the antioxidant activity were 60 and 80% ethanol and 20% methanol for the peel.

Keywords: *Punica granatum* L.; phenolic compounds; antioxidant activity; extractors; extraction solvent.

1.1 INTRODUÇÃO

A romã (*Punica granatum* L.) é uma importante fonte de compostos fenólicos devido à presença em diferentes partes da fruta (RUSSO et al., 2018) e ganhou fama por suas aplicações medicinais desde os tempos antigos (KARIMI et al., 2017).

A principal causa do efeito positivo da romã para a saúde é a sua atividade antioxidante (KALAYCIOGLU; ERIM, 2017), efeito biológico que exerce por meio de capacidade de eliminação de radicais livres por seus compostos fenólicos (KARIMI et al., 2017).

Com a crescente consciência do consumo de alimentos que contenham ingredientes bioativos naturais, como antioxidantes, para melhorar e proteger a saúde humana, frutas e seus resíduos são produtos alimentícios essenciais que contêm quantidades substanciais desses bioativos, como a romã (LAMPAKIS et al., 2021). O perfil bioativo é influenciado pelo cultivar, região de cultivo, clima, maturidade, práticas de cultivo e condições de armazenamento (FERNANDES et al. 2017).

Os compostos orgânicos produzidos pelos vegetais são conhecidos como metabólitos secundários, e possuem funções ecológicas importantes (TAIZ; ZEIGER, 2013), e estes metabólitos são de diferentes famílias, podendo ser altamente induzíveis em resposta aos estresses bióticos ou abióticos (PAGARE et al., 2015). Além do papel vital na defesa da planta, os metabólitos secundários também são utilizados como medicamentos, aromatizantes, produtos farmacêuticos, agroquímicos, fragrâncias, corantes, biopesticidas e aditivos alimentares (JAMWAL et al., 2018).

Dentre estes metabólitos estão os compostos fenólicos e de acordo com De La Rosa et al. (2019) existem mais de 8.000 compostos fenólicos, sendo estes com grande variabilidade estrutural, contendo pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxila em sua estrutura, e são classificados em dois grupos principais, os flavonoides (flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonas, diidroflavonóis, flavan-3-ols, proantocianidinas e antocianidinas) e não flavonoides (ácidos fenólicos), sendo os flavonoides os mais bioativos.

A extração é a primeira e importante etapa no isolamento e purificação dos componentes bioativos do material vegetal (CUJÍC et al., 2016; BELWAL et al., 2020). A natureza química, o método de extração empregado, o tamanho das

partículas da amostra, o tempo e as condições de armazenamento, bem como presença de substâncias interferentes, podem influenciar na extração de compostos fenólicos em materiais vegetais (NACZK; SHAHIDI, 2004; 'CUJIĆ et al., 2016; SUWAL; MARCINIAK, 2018).

Os compostos fenólicos variam significativamente em polaridade, tornando difícil desenvolver um único método para a extração ideal de todos os compostos (GARCIA-SALAS et al., 2010), sendo impossível desenvolver um solvente padrão e parâmetros de extração que seja adequado para todos os tipos de compostos fitoquímicos, necessitando de um processo de triagem para identificar o melhor solvente e concentração para um procedimento de extração específico para uma amostra particular (MAGANGANA et al., 2021).

No mercado nacional, as principais cultivares de romã encontradas são a Wonderful, Rubi e Comum (FERREIRA, 2017). Para a romã 'Comum', até o presente momento, não existem informações sobre a metodologia de extração de compostos antioxidantes, como os compostos fenólicos, apesar do perfil fenólico para muitas cultivares de romã pelo mundo já terem sido publicado por alguns autores (ABID et al., 2017; MOTTAGHIPISHEH et al., 2018; RUSSO et al., 2020).

Desta forma objetivou-se realizar a adequação de protocolos de extração para determinação de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e capacidade antioxidante (AA) da polpa e casca da romã 'Comum'.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Material Vegetal

A romã 'Comum' utilizada neste trabalho foi colhida no dia 5 de junho de 2019, no estádio de maturação comercial (parâmetro utilizado pelo produtor), quando a casca atingiu a cor característica da variedade, com superfície brilhante e cerosa (Figura 1), em pomar comercial (Figura 2) no município de Alvares Machado (latitude 22° 04' 46" S, longitude 51° 28' 19" O e 475 m de altitude), região de Presidente Prudente, estado de São Paulo. No mesmo dia da colheita, os frutos foram transportados em carro com ar condicionado até o laboratório de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP de Botucatu/SP, onde foram selecionados manualmente e visualmente, de forma

aleatoria 20 frutos, padronizados por tamanho, sem danos físicos e biológicos. A separação das sementes e da casca foi feita manualmente em ambiente sem luz. A polpa (sarcotesta) (MELGAREJO et al., 2020) foi extraída pela pressão realizada com auxílio de um rolo de massa sobre as sementes (Figura 3). As amostras de polpa e casca de romã foram congeladas em nitrogênio líquido imediatamente após separação e mantidas em freezer com temperatura de -20° C até o momento das análises.

Figura 1 – Romã ‘Comum’ em estágio de maturação comercial, com cor da casca característica da variedade, com superfície brilhante e cerosa



Fonte: Autor (2019)

Figura 2 - Pomar de cultivo comercial de romã ‘Comum’ em Alvares Machado, SP



Fonte: Autor (2019)

Figura 3 – Separação manual de sementes e casca de romã ‘Comum’ (A), e extração de polpa (sarcotesta) com auxílio de rolo de massa em ambiente sem luz (B)



Fonte: Autor (2019)

1.2.2 Extração

Para análise de compostos fenólicos totais (CFT), 100 mg de casca de romã congelada e macerada em nitrogênio líquido e 200 mg de polpa de romã congelada foram pesados em tubos falcon e extraídos com 10 mL de solvente de extração. Para análise de flavonoides totais (FT), 500 mg de polpa de romã congelada foram pesados em tubos falcon e extraídos com 10 mL de solvente de extração. Para atividade antioxidante (AA) pelo método DPPH, 10 mg de casca de romã congelada e macerada em nitrogênio e 20 mg de polpa de romã congelada foram pesados em tubos falcon e extraídos com 10 mL de solvente de extração.

O processo de extração foi feito em banho ultrassônico por 20 minutos e a mistura foi centrifugada a 6000 rpm durante 15 minutos para CF e AA, e durante 45 minutos para FT. Posteriormente retirou-se o sobrenadante para composição do extrato final. Após prontos os extratos da casca da romã foram diluídos na proporção de 0,5 ml de extrato para 9,5 ml de solvente de extração para CFT e na proporção de 1 ml de extrato para 14 ml de solvente de extração para AA.

Os pesos utilizados para as amostras foram previamente definidos. O processo de extração foi realizado em triplicata.

1.2.2.1 Solvente de extração para compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante

Para compostos fenólicos totais e flavonoides totais as amostras de casca e polpa de romã foram extraídas utilizando os solventes: acetona:água (80:20, v/v), etanol:água (80:20, v/v), metanol:água (80:20, v/v) e água. Para a atividade antioxidante foram utilizados os solventes: acetona:água (80:20, v/v), etanol:água (80:20, v/v) e metanol:água (80:20, v/v) (MOKRANI; MADANI, 2016), com modificações. Os tipos de solventes utilizados para cada análise foram previamente testados.

1.2.2.2 Concentração de solvente para compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante

O melhor solvente de extração determinado previamente foi utilizado. Para a extração de CFT e AA (DPPH) para polpa e casca de frutos da romã utilizou-se diferentes concentrações do solvente (20, 40, 60, 80 e 100%, v/v) (MOKRANI; MADANI, 2016), com modificações. Para FT para polpa o melhor solvente foi definido como água.

1.2.2.3 Acidez do solvente para compostos fenólicos totais

A melhor concentração de solvente de extração determinado previamente foi utilizada. Segundo metodologia de Mokrani e Madani (2016) com modificações, para a extração de CFT das amostras de polpa e casca de frutos da romã extraiu-se variando as concentrações de acidez com HCl (0,1; 0,5; 1; 1,5 e 2 N), sendo utilizada para a extração a proporção de 85% de solvente e 15% de HCl (85:15, v/v). O uso ou não da acidificação dos solventes utilizados foram previamente testados.

1.2.3 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

A quantidade de CFT nos extratos de polpa e casca dos frutos foi determinada de acordo com o método Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). Uma alíquota de 0,5 ml dos extratos ou solução padrão de ácido gálico (5 a 100 ug/ml) e 2,5 ml de reagente de Folin-Ciocalteu (diluído em água 1:10) foram adicionadas em tubo de ensaio. Após 5 minutos foram adicionados 2 ml de carbonato de sódio (4%, p/v). Os tubos foram agitados e incubados em sala escura

à temperatura ambiente por 2 horas. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (BEL SP 1105) a 765 nm (comprimento de onda pré-definido em varredura). As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama de amostra fresca (mg GAE/g).

1.2.4 Determinação de flavonoides totais

A quantidade de FT nos extratos de polpa dos frutos foi determinada de acordo com o método de Zhishen et al. (1999). Adicionou-se uma alíquota de 1 ml dos extratos ou solução padrão de rutina (20 a 200 ug/ml) em tubos de ensaio, 4 ml de água deionizada e 0,30 ml de NaNO_2 (5%). Após cinco minutos foi adicionado 0,3 ml de AlCl_3 (10%). Percorrido mais cinco minutos foi adicionado 2 ml de NaOH a 1 mol L^{-1} . Todos os procedimentos ocorreram em temperatura ambiente. As leituras foram realizadas contra o branco em comprimento de onda de 510 nm. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como mg equivalente de rutina por grama de amostra fresca (mg RE/g).

1.2.5 Atividade Antioxidante pelo método DPPH

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) é baseado na captura do radical DPPH estável (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes e foi utilizado para determinar a AA nos extratos de polpa e casca dos frutos. Em tubos de ensaio adicionou-se 3,0 ml do solvente de extração PA, uma alíquota de 0,5 ml dos extratos ou solução padrão de Trolox e 0,3 ml do radical DPPH. As misturas foram deixadas durante 45 minutos em temperatura ambiente, em sala escura e a absorvância medida a 517 nm contra um branco. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em mg equivalente Trolox por grama de amostra fresca (mg Trolox/g).

1.2.6 Delineamento experimental e análise estatística

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) de fator único, com três repetições para determinar as condições ideais para a extração de CFT, FT e

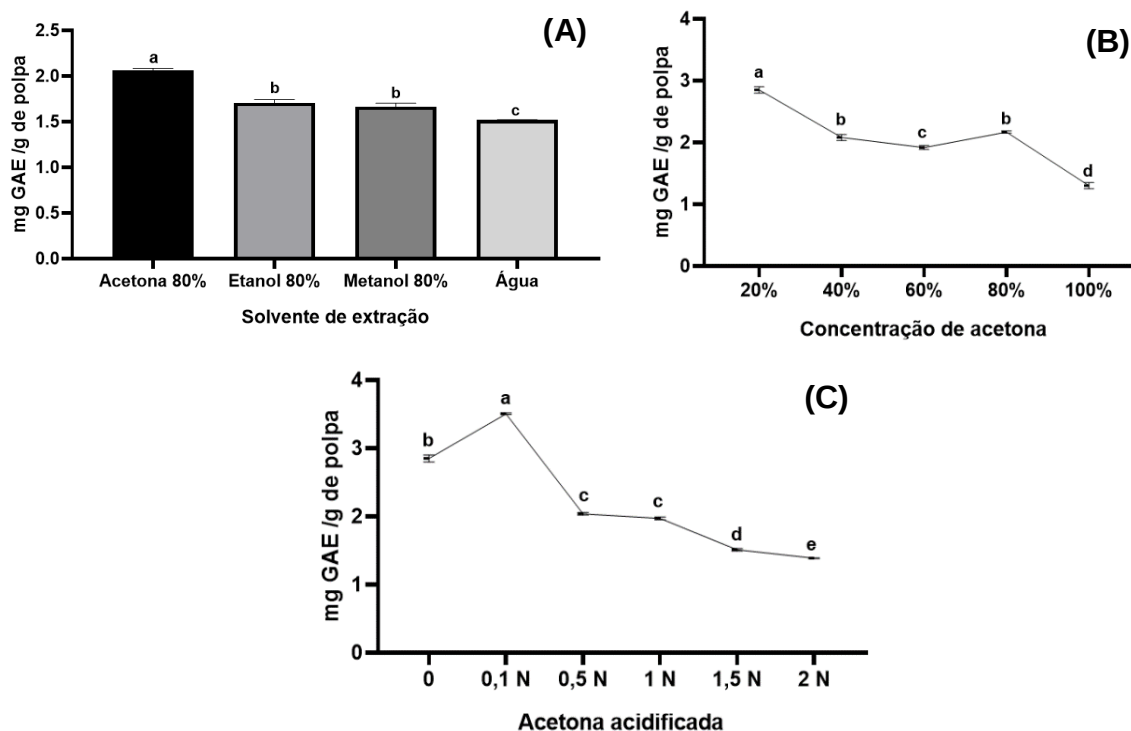
AA (DPPH) para polpa e casca de frutos de romã. Diferenças significativas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os resultados foram apresentados em médias com desvio padrão (média $\pm$ DP). As análises foram realizadas pelo software Sisvar versão 5.6 (Lavras, MG, Brasil) e os gráficos foram gerados pelo GraphPad Prism versão 8.0.1 (San Diego, CA, EUA).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Compostos fenólicos totais

De acordo com os resultados obtidos (Figuras 4 e 5) pode-se observar que todos os extratos para polpa e casca de romã 'Comum' continham compostos fenólicos (CFT) e o teor desses compostos variou de acordo com o solvente de extração, concentração do solvente e acidificação do solvente de extração utilizados.

Figura 4 - Efeito do tipo de solvente de extração (A), concentração do solvente (B) e acidificação do solvente (C) para compostos fenólicos totais para a polpa de romã 'Comum'



Os valores são apresentados como médias com o desvio padrão, e as letras (a - e) representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Entre os solventes de extração testados (Figura 4A), a acetona 80% foi significativamente ($p < 0,05$) o mais eficiente para extrair CFT da polpa (2,06 mg GAE/ g). A água (1,52 mg GAE/ g) apresentou o menor valor para extração de CFT para a polpa da romã. Estes resultados diferem dos obtidos por Singh et al. (2014), que observaram o maior valor de compostos fenólicos totais no extrato etanólico da polpa da romã, enquanto o menor teor foi no extrato de acetona.

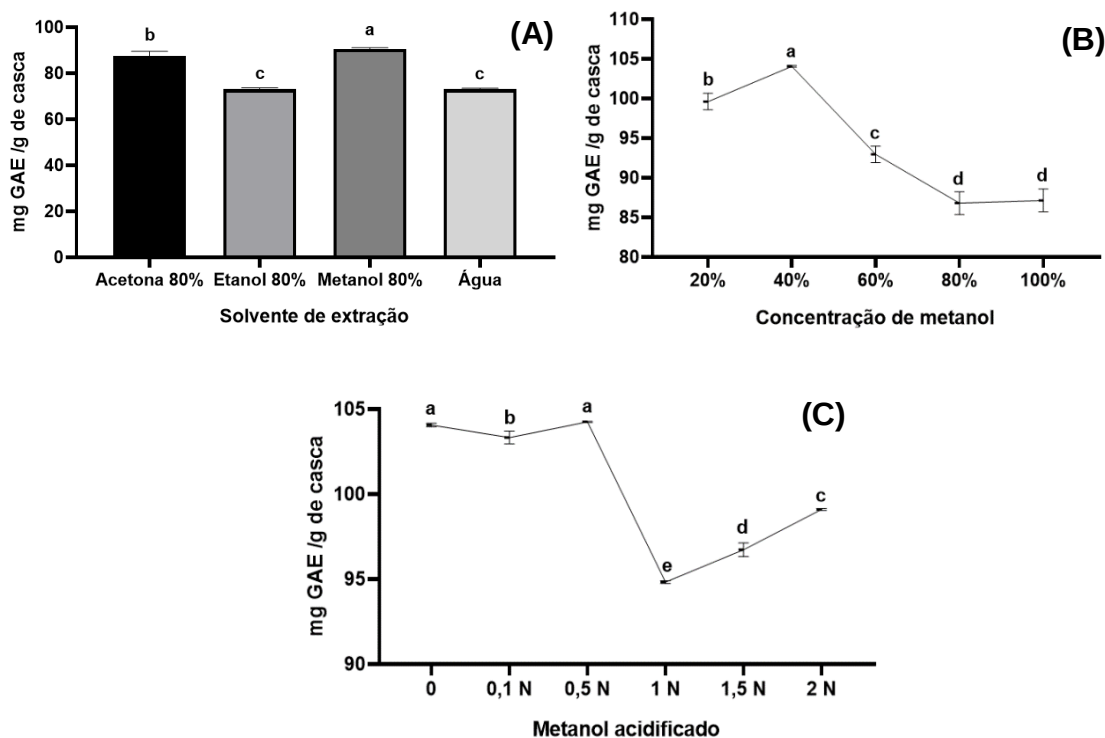
A eficiência de extração de compostos fenólicos é afetada pelo solvente de extração, como foi observado para os diferentes solventes utilizados neste trabalho e isso ocorre segundo Alara et al. (2021) porque as diferentes estruturas destes compostos resultam em diferentes propriedades de solubilidade.

Para a concentração do solvente de extração para CFT da polpa da romã (Figura 4B), pode-se observar que a acetona 20% foi a mais eficiente (2,85 mg GAE/ g), diferindo estatisticamente das demais concentrações testadas. Sendo que a extração com acetona 100% foi a menos eficiente (1,3 mg GAE/ g). Corroborando com Mashkor (2014) que observou que a maioria dos solventes puros exibem poderes de extração fracos, sendo que a mistura de um solvente apolar com água pode aumentar o índice de polaridade do solvente, consequentemente aumentando o poder de extração.

A acidificação da acetona 20%, com HCl 0,1 N (3,51 mg GAE/ g) apresentou a maior eficiência de extração para CFT da polpa da romã (figura 4C). De acordo com Mokrani e Madani (2016) a acidificação do solvente de extração pode atuar na estabilidade dos fenólicos e aumentar sua dissolução, ou causar sua degradação de acordo com a concentração de ácido, o que pode ter ocorrido neste trabalho.

Pelo exposto na figura 5A, pode-se observar que o metanol 80% foi significativamente ($p < 0,05$) o solvente de extração mais eficiente para extrair CFT da casca (90,57 mg GAE/ g), seguido da acetona 80% (87,5 mg GAE/ g). O metanol 40% foi a concentração do solvente de extração mais eficiente na extração de CFT para a casca da romã 'Comum' (Figura 5B). A acidificação do metanol 40% com HCl a 0,5 N não diferiu da extração utilizando metanol 40% sem acidificação (figura 5C).

Figura 5 - Efeito do tipo de solvente de extração (A), concentração do solvente (B) e acidificação do solvente (C) para compostos fenólicos totais para a casca de romã 'Comum'



Os valores são apresentados como médias com o desvio padrão, e as letras (a - e) representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Resultados semelhantes foram relatados por Al-Rawahi et al. (2013) que observaram maior capacidade de extração para o extrato aquoso e maior teor de fenólicos totais do que os extratos com metanol e etanol (99,9%) para a casca de romã.

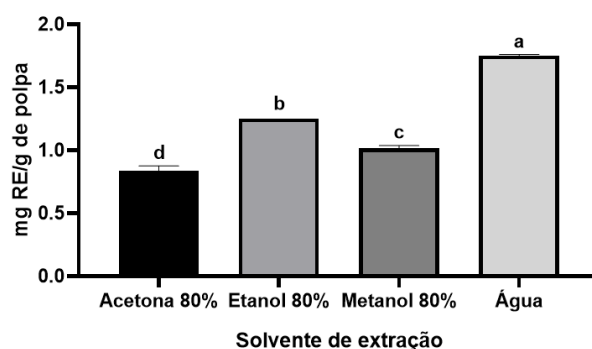
Kennas e Amellal-Chibane (2019) observaram diferentes resultados estudando a influência do solvente na extração do conteúdo fenólico total da casca da romã doce, no qual obtiveram os maiores valores para os extratos etanólicos (96%) e água/etanol (50:50), com 638,17 e 625,525 mg equivalente de ácido gálico/g, respectivamente. Já Abid et al. (2017) avaliando o perfil fenólico de cascas de romã tunisianas ('Acide', 'Gabsi', 'Nebli' e 'Tounsi'), utilizando os solventes de extração água, etanol e acetona, relataram que entre os solventes estudados, a acetona apresentou o maior valor para o ecótipo Acide, com 304,6 mg equivalente de ácido gálico/g.

Segundo Martins et al. (2013) a solubilidade das espécies orgânicas em solventes polares ou apolares, de uma maneira geral, está relacionada com a polaridade do soluto e do solvente em questão.

1.3.2 Flavonoides totais

A água foi significativamente o melhor solvente para extração de flavonoides totais (FT) para a polpa de frutos de romã 'Comum' (Figura 6).

Figura 6 - Efeito do tipo de solvente na extração de flavonóides totais da polpa de romã 'Comum'



Os valores são apresentados como médias com o desvio padrão, e as letras (a - d) representam diferença significativa ($p < 0,05$).

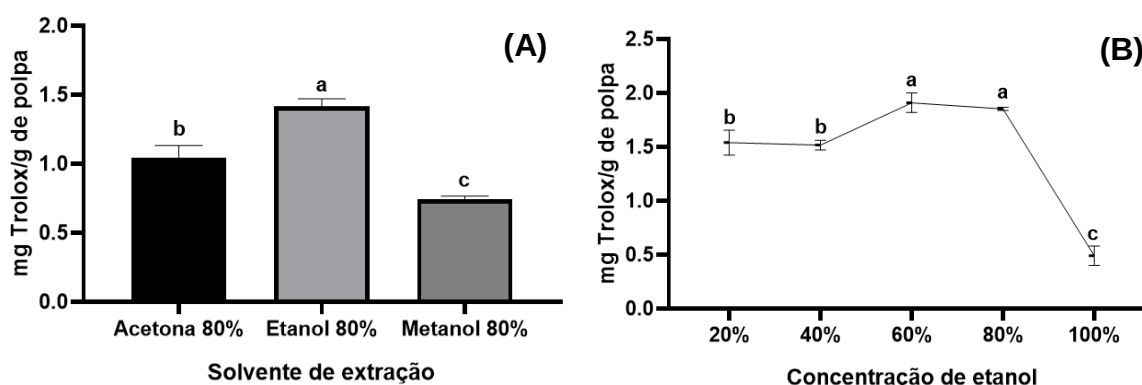
A extração com água apresentou teores de 1,75 mg RE/g de polpa, seguido por etanol 80% (1,25 mg RE/g), metanol 80% (1,02 mg RE/g) e acetona 80% (0,84 mg RE/g). De acordo com Chávez-González et al. (2020) a natureza do solvente afeta o tipo de flavonoide extraído e influencia diretamente a atividade biológica dos compostos recuperados.

Segundo Petigny et al. (2015) a água é a molécula mais abundante da Terra e tem enormes benefícios como solvente de extração verde, sendo barata, não inflamável e não tóxica, proporcionando oportunidades de processamento limpo e prevenção da poluição. Desta forma o uso da água como solvente para extração de compostos bioativos da romã 'Comum', como os flavonoides, pode ser uma vantagem, por ser uma opção mais sustentável e ecologicamente mais correta.

1.3.3 Atividade antioxidante

Todos os extratos exibiram atividade antioxidante para a polpa da romã 'Comum' (Figura 7A), sendo que o solvente de extração etanol 80% apresentou maior valor que a acetona 80% e metanol 80%. A atividade antioxidante variou de 1,41 a 0,74 mg de Trolox/g de polpa. Para a concentração do solvente de extração (Figura 7B), o etanol 60% apresentou o maior valor para atividade antioxidante, com 1,91 mg de Trolox/g de polpa, não diferindo estatisticamente do etanol 80% e o menor valor foi observado para a concentração de etanol puro (100%) com 0,49 mg de Trolox/g de polpa.

Figura 7 - Efeito do tipo de solvente de extração (A) e concentração do solvente (B) para a atividade antioxidante pelo método DPPH para a polpa de romã 'Comum'



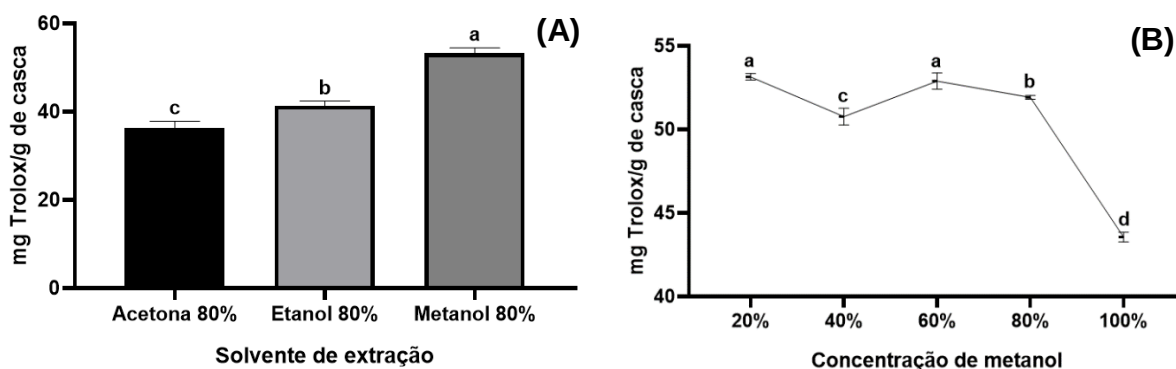
Os valores são apresentados como médias com o desvio padrão, e as letras (a - c) representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Embora a extração com acetona para a polpa de romã 'Comum' tenha mostrado maior eficiência de extração para CFT, a atividade antioxidante foi maior pela extração com etanol. Podendo esta condição observada ter ocorrido, segundo Som et al. (2019) pelo fato de que a reação do DPPH com alguns fenóis, é reversível, apresentando baixa atividade antioxidante, bem como uma lenta taxa de reação entre o DPPH e as moléculas do substrato. Também por diferente poder de redução pelos compostos fenólicos em diferentes extratos.

Para a casca o melhor desempenho para atividade antioxidante foi observado para o solvente de extração metanol 80% (Figura 8A), com média de 53,21 mg de Trolox/g de casca de romã 'Comum'. Sendo que foram observados valores médios

para atividade antioxidante de 41,36 e 36,33 mg de Trolox/g de casca para o etanol 80% e acetona 80%.

Figura 8 - Efeito do tipo de solvente de extração (A) e concentração do solvente (B) para a atividade antioxidante pelo método DPPH para a casca de romã 'Comum'



Os valores são apresentados como médias com o desvio padrão, e as letras (a - d) representam diferença significativa ($p < 0,05$).

A concentração do solvente de extração (Figura 8B), metanol 20% e 60% apresentaram em média para atividade antioxidante 53,15 e 52,89 mg de Trolox/g de casca de romã, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. O menor valor observado para atividade antioxidante foi para o metanol puro (100%) com 43,55 mg de Trolox/g de casca de romã.

Segundo Kennas e Amellal-Chibane (2019) a extração de antioxidantes fenólicos da casca de romã é afetada consideravelmente pela escolha do solvente de extração. Singh et al. (2014) relataram que as polaridades dos solventes desempenham um papel vital no processo de extração, pois com a mudança na polaridade do solvente, sua capacidade de dissolver um grupo específico de compostos antioxidantes altera e influencia a estimativa da atividade antioxidante. Desta forma, para a casca da romã 'Comum' pode ser observado que a extração utilizando metanol foi maior para CFT e para a atividade antioxidante.

1.4 CONCLUSÕES

Nas condições em que o presente trabalho foi realizado, pode-se concluir:

- Um único solvente não foi capaz de extrair os compostos bioativos das amostras de polpa e casca de romã 'Comum'.

- Para extração de compostos fenólicos totais da polpa de romã 'Comum' as melhores condições de extração foram a acetona 20% acidificada com HCl a 0,1N e para a casca as melhores condições de extração foram o metanol 40% sem acidificação.
- O melhor solvente de extração para flavonoides totais para polpa da romã 'Comum' foi a água.
- Para a polpa da romã 'Comum' as melhores condições para determinação da atividade antioxidante foram o etanol 60 e 80% e para a casca foram o metanol 20%.

REFERÊNCIAS

- ABID, M. *et al.* Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC–MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 9, p. 2890-2891, 2017.
- AL-RAWAHI, A. S. *et al.* Chemical Composition, Water Sorption Isotherm, and Phenolic Contents in Fresh and Dried Pomegranate Peels. **Drying Technology**, v. 31, p. 257-263, 2013.
- ALARA, O. R. *et al.* Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200-214, 2021.
- BELWAL, T. *et al.* Recent advances in scaling-up of non-conventional extraction techniques: Learning from successes and failures. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 127, p. 1-25, 2020.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.
- Chávez-González, M. L. *et al.* Conventional and Emerging Extraction Processes of Flavonoids. **Processes**, v. 8, n. 434, p. 1-29, 2020.
- CUJÍĆ, N. *et al.* Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry**, v. 194, p. 135–142, 2016.
- DE LA ROSA, L. A. *et al.* Phenolic Compounds. In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**. Woodhead Publishing, 2019, p. 253-271.
- FERNANDES, L. *et al.* Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. **European Food Research and Technology**, v. 243, p. 1799–1814, 2017.
- FERREIRA, A. F. A. **Propagação vegetativa de Romãzeira (*Punica granatum* L.)**. 2017. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2017.
- GARCIA-SALAS, P. *et al.* Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, p. 8813–8826, 2010.
- KALAYCIOGLU, Z.; ERIM, F. B. Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. **Food Chemistry**, v. 221, p. 496–507, 2017.
- KARIMI, M.; SADEGHI, R.; KOKINI, J. Pomegranate as a promising opportunity in medicine and nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 59–73. 2017.

KENNAS, A.; AMELLAL-CHIBANE, H. Comparison of five solvents in the extraction of phenolic antioxidants from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. **The North African Journal of Food and Nutrition Research**, v. 3, p. 140-147, 2019.

JAMWAL, K.; BHATTACHARYA, S.; PURI, S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 9, p. 26–38, 2018.

LAMPAKIS, D.; SKENDERIDIS, P.; LEONTOPOULOS, S. Technologies and Extraction Methods of Polyphenolic Compounds Derived from Pomegranate (*Punica granatum*) Peels. A Mini Review. **Processes**, v. 9, n. 236, p. 1-14, 2021.

MAGANGANA, T. P. *et al.* Effect of Solvent Extraction and Blanching Pre-Treatment on Phytochemical, Antioxidant Properties, Enzyme Inactivation and Antibacterial Activities of 'Wonderful' Pomegranate Peel Extracts. **Processes**, v. 9, n. 2, p. 1-24, 2021.

MARTINS, C. R. *et al.* Solubilidade das Substâncias Orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p.1248–1255, 2013.

MASHKOR, I. M. A. A. Total phenol, Total Flavonoids and Antioxidant Activity of Pomegranate Peel. *International Journal of ChemTech Research*, v. 6, n. 11, p. 4656-4661, 2014.

MELGAREJO, P. *et al.* Pomegranate (*Punica granatum* L.) a dry pericarp fruit with fleshy seeds. **Trends in Food Science & Technology**, v. 102, p 232–236, 2020.

MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic peach. **Separation and Purification Technology**, v. 162, p 68-76, 2016.

MOTTAGHIPISHEH, J. *et al.* Total anthocyanin, flavonoid, polyphenol and tannin contents of seven pomegranate cultivars grown in Iran. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 17, n. 3, p 211-217. 2018.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95–111, 2004.

PAGARE, S. *et al.* Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 9, n. 3, p. 293-304, 2015. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/283132113_Secondary_metabolites_of_plants_and_their_role_Overview>. Acesso em 01 agosto 2018.

PETIGNY, L., *et al.* Water as green solvent for extraction of natural products. In: CHEMAT, F., STRUBE, J. (Eds.). **Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015, p. 237-264.

RUSSO, M. *et al.* Analysis of phenolic compounds in different parts of pomegranate (*Punica granatum*) fruit by HPLC-PDA-ESI/MS and evaluation of their antioxidant activity: application to different Italian varieties. **Analytical and Bioanalytical**

Chemistry, v. 410, p. 3507–3520. 2018. Disponível em:
<<https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-018-0854-8>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

RUSSO, M. *et al.* Characterization of the polyphenolic fraction of pomegranate samples by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry detection. **Natural Product Research**, v. 34, n. 1, p. 39-45. 2020.

SINGH, M. *et al.* Influence of the solvents on the extraction of major phenolic compounds (punicalagin, ellagic acid and gallic acid) and their antioxidant activities in pomegranate aril. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 2070–2077, 2014.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, n., p. 152-178, 1999.

SOM, A. M. *et al.* A comparative study on foliage and peels of *Hylocereus undatus* (white dragon fruit) regarding their antioxidant activity and phenolic content. **Heliyon**, v. 5, n. 2, p. e01244, 2019.

SUWAL, S.; MARCINIAK, A. Technologies for the Extraction, Separation and Purification of polyphenols – A Review. **Nepal Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 74-91, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artemed, 2013. 918p.

ZHISHEN, J. *et al.* The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v.64, p.555-559, 1999.

CAPÍTULO 2

RADIAÇÃO GAMA NA CONSERVAÇÃO REFRIGERADA DA ROMÃ 'COMUM'

RESUMO

Acredita-se que este trabalho represente o primeiro relato de caracterização e uso de radiação gama em pós-colheita de romã 'Comum' cultivada no Brasil. Desta forma é de extrema importância conhecer o potencial dos frutos desta cultivar, que podem apresentar características de interesse para o consumo *in natura*, processamento industrial ou para o uso medicinal. Objetivou-se com o presente estudo caracterizar a romã 'Comum' e avaliar a influência da radiação gama no metabolismo primário. Os frutos foram colhidos no município de Alvares Machado, SP. No laboratório de Frutas e Hortaliças do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP de Botucatu, os frutos colhidos foram selecionados, embalados, acondicionados em caixas de papelão revestidas internamente de poliestireno expandido e encaminhados para o Centro de Tecnologia das Radiações - CTR - do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN - USP/Campus de São Paulo, onde foram submetidos a doses de irradiação com ^{60}Co . Os frutos foram armazenados a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e $90 \pm 5\%$ de UR em câmara fria, durante 30 dias e avaliados a cada 5 dias. Foram determinadas a composição mineral, as características centesimais e propriedades físico-químicas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 6×7 , sendo seis doses de irradiação (0,0 kGy; 0,3 kGy; 0,6 kGy; 0,9 kGy; 1,2 kGy e 1,5 kGy) e sete dias de avaliação (zero, 5, 10, 15, 20, 25 e 30), com três repetições. A irradiação na dose 1,5 KGy associada a refrigeração reduziu a perda de massa dos frutos. O uso da irradiação não alterou a firmeza dos frutos, o ângulo de cor Hue da casca e a acidez titulável da polpa. Foi verificado para todas as doses de radiação gama e para a testemunha que a refrigeração foi efetiva na perda de massa.

Palavras-chave: *Punica granatum* L.; conteúdo mineral; irradiação; cobalto-60.

ABSTRACT

It is believed that this work represents the first report of characterization and use of gamma radiation in postharvest of 'Comum' pomegranate cultivated in Brazil. Thus, it is extremely important to know the potential of the fruits of this cultivar, which may present characteristics of interest for fresh consumption, industrial processing or for medicinal use. The objective of the present study was to characterize the 'Comum' pomegranate and to evaluate the influence of gamma radiation on primary metabolism. The fruits were harvested in the municipality of Alvares Machado, SP. In the Fruit and Vegetables Laboratory of the Vegetable Production Department at FCA/UNESP in Botucatu, the harvested fruits were selected, packed, packed in cardboard boxes lined internally with expanded polystyrene and sent to the Radiation Technology Center - CTR - of the Instituto Energy and Nuclear Research - IPEN - USP/São Paulo Campus, where they were subjected to doses of irradiation with ^{60}Co . The fruits were stored at $10 \pm 1^\circ\text{C}$ and $90 \pm 5\%$ RH in a cold chamber for 30 days and evaluated every 5 days. Mineral composition, proximate characteristics and physicochemical properties were determined. The experimental design was completely randomized (DIC) in a 6×7 factorial scheme, with six irradiation doses (0.0 kGy; 0.3 kGy; 0.6 kGy; 0.9 kGy; 1.2 kGy and 1, 5 kGy) and seven days of evaluation (zero, 5, 10, 15, 20, 25 and 30), with three replications. Irradiation at a dose of 1.5 KGy associated with refrigeration reduced fruit mass loss. The use of irradiation did not change the firmness of the fruits, the Hue color angle of the peel and the titratable acidity of the pulp. It was verified for all doses of gamma radiation and for the control that the refrigeration was effective in the loss of mass.

Keywords: *Punica granatum* L.; mineral content; irradiation; coblate-60.

2.1 INTRODUÇÃO

A romã (*Punica granatum* L.) é um fruto simbólico desde os tempos antigos (WU; TIAN, 2017), e segundo Boussaa et al. (2020) a romã ganhou muita atenção como alimento funcional e fonte nutracêutica. De acordo com Vázquez-Araújo et al. (2014) a fruta e seus produtos estão sendo amplamente promovidos aos consumidores como alternativas saudáveis para sua dieta diária.

A aceitabilidade dos frutos de romã pelos consumidores e indústrias depende de uma combinação de vários atributos, incluindo aparência física (cor e tamanho), sabor (teor de açúcar, acidez e aroma) e compostos nutricionais (fenóis, minerais, vitaminas) (BOUSSAA et al., 2020).

Suzuki (2016) relata que o tamanho, a coloração e sanidade dos frutos de romã são aspectos a serem considerados para a compra, sendo requeridos frutos sem manchas, avermelhados e graúdos, porém os consumidores sugerem o fornecimento de informações referentes aos componentes nutraceuticos, seus efeitos e benefícios.

Os açúcares, ácidos orgânicos, proteínas, aminoácidos e lipídios fazem parte dos metabolitos primários da romã (BAR-YA'AKOV et al., 2019), sendo importantes para a qualidade da fruta (BEAUVOIT et al., 2018). De acordo com seu papel no metabolismo vegetal, os metabólitos primários estão voltados para o crescimento e desenvolvimento, como carboidratos, aminoácidos, proteínas e lipídios (CROTEAU et al., 2000), abrangendo reações e vias vitais para a sobrevivência (POTT et al., 2019) e são importantes para os atributos de sabor e para o índice nutricional da fruta (BAR-YA'AKOV et al., 2019).

A romã 'Comum' é cultivada no Brasil e segundo Suzuki (2016) produz frutos graúdos durante todo o ano, diferentemente de outros cultivares produzidas fora do Brasil e possui casca com coloração amarelada e polpa rósea clara.

Os frutos da romã devem ser colhidos somente após atingir a maturidade adequada (KUMAR et al., 2018), pois são frutos não climatéricos (SHULMAN et al., 1984) e não amadurecem após a colheita (KAHRAMANOĞLU; USANMAZ, 2016). Os índices de maturidade para a colheita podem ser definidos com base no período de maturação (dias após a plena floração), em que os frutos ficam prontos para a colheita de acordo com cada cultivar e estação do ano; cor do fruto (casca com cor

característica de variedade, com superfície brilhante e cerosa); formato da coroa e da fruta; cor da semente; teor de sólidos solúveis (SS) de 12-16° Brix; acidez titulável (AT) abaixo de 0,8%. A fruta madura tem uma relação SS/AT entre 25 a 40, sendo um dos indicadores de maturidade mais confiáveis (KUMAR et al., 2018). De acordo com Suzuki a romã cv. comum produzida nas condições edafoclimáticas de Narandiba (SP) apresentam da gema reprodutiva entumescida até a maturação completa em média 111 dias no inverno e 105 dias no verão.

O manuseio adequado da romã, associado a tecnologias que reduzem a sua deterioração, possibilita sua comercialização *in natura* em mercados mais distantes, uma vez que reduz a perda dos atributos de qualidade visual, físico-químicos e nutricionais (MOREIRA et al., 2015), sendo que a perda de água durante o armazenamento e transporte é um importante fator limitante para os consumidores (PAREEK et al., 2015).

A irradiação com radiação ionizante (raios gama) e não ionizante tem sido amplamente utilizada como tecnologia pós-colheita para proteger os produtos contra a deterioração microbiológica e estender sua vida útil (DE LA ROSA et al., 2019).

A tecnologia de irradiação de frutas e hortaliças pós-colheita tem como principal interesse a redução ou o retardo nos danos causados por doenças ou por insetos. É também utilizada como método de conservação, prolongando o armazenamento pelo retardo do amadurecimento e do brotamento de alguns produtos (CHITARRA; CHITARRA, 2005). A irradiação pode impedir a divisão celular, de bactérias e células de organismos superiores, alterando suas estruturas moleculares, além de inibir o amadurecimento de alguns frutos e legumes, ao produzir reações bioquímicas nos processos fisiológicos dos tecidos vegetais (VIEITES, 2009).

As formas radioativas do elemento cobalto (^{60}Co) ou do elemento cério (^{137}Cs) emitem raios gama (EUSTICE, 2020). O ^{60}Co é a fonte de maior aceitação por apresentar-se na forma metálica e ser insolúvel em água, proporcionando maior segurança ambiental (SILVA; ROZA, 2010). Possui uma meia vida de aproximadamente cinco anos. Diferentemente dos tratamentos químicos, não deixa resíduos e os produtos irradiados podem ser transportados, armazenados ou consumidos imediatamente após o tratamento (VIEITES, 2009).

Verificando-se a escassez de informações de pós-colheita sobre a romã 'Comum' e a necessidade de informações sobre sua composição, o que pode

estimular sua comercialização e consumo, objetivou-se com o presente estudo caracterizar a romã 'Comum' e avaliar a influência da radiação gama no metabolismo primário.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

A romã 'Comum' utilizada neste trabalho foi colhida no dia 5 de junho de 2019, em estágio de maturação comercial (parâmetro utilizado pelo produtor), quando a casca atingiu a cor característica de variedade, com superfície brilhante e cerosa, em pomar comercial no município de Alvares Machado (latitude 22° 04' 46" S, longitude 51° 28' 19" O e 475 m de altitude), região de Presidente Prudente, estado de São Paulo. Os frutos foram transportados, no mesmo dia da colheita, em carro com ar condicionado até o laboratório de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP de Botucatu/SP, onde 380 frutos foram selecionados manualmente e visualmente, de forma aleatoria para uniformização do lote, padronizados por tamanho, sem presença de danos físicos e biológicos (Figura 1).

Figura 1 – Romã 'Comum' selecionada para uniformização do lote (A e B)

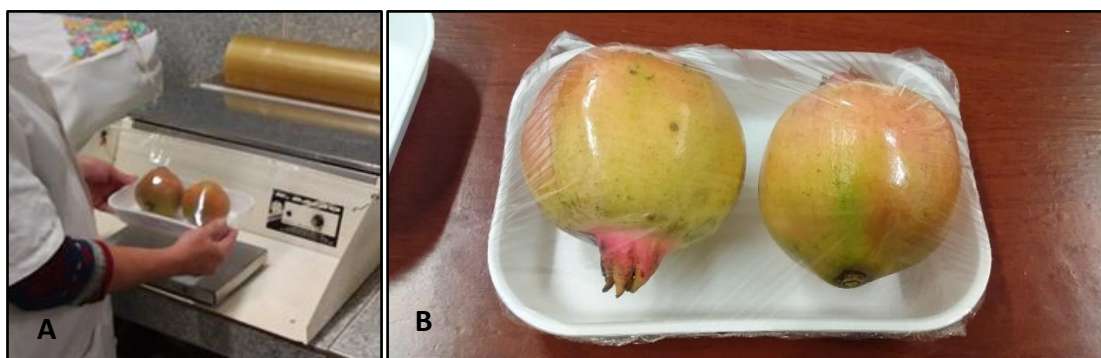


Fonte: Autor (2019)

2.2.2 Irradiação dos frutos

Foram embalados aleatoriamente dois frutos por bandeja de poliestireno expandido revestidos com filme de policloreto de vinila (espessura 0,020mm) (Figura 2), com três repetições e em seguida acondicionados em caixas de papelão revestidas internamente de poliestireno expandido (Figura 3). Os frutos embalados foram encaminhados em carro com ar condicionado para o IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP/Campus de São Paulo, onde foram submetidos a doses de irradiação com Cobalto 60 (^{60}Co) em irradiador multipropósito do tipo compacto onde utiliza raios gama (Figura 4).

Figura 2 – Romã ‘Comum’ embalada em bandeja de poliestireno expandido e revestido com filme de policloreto de vinila (A e B)



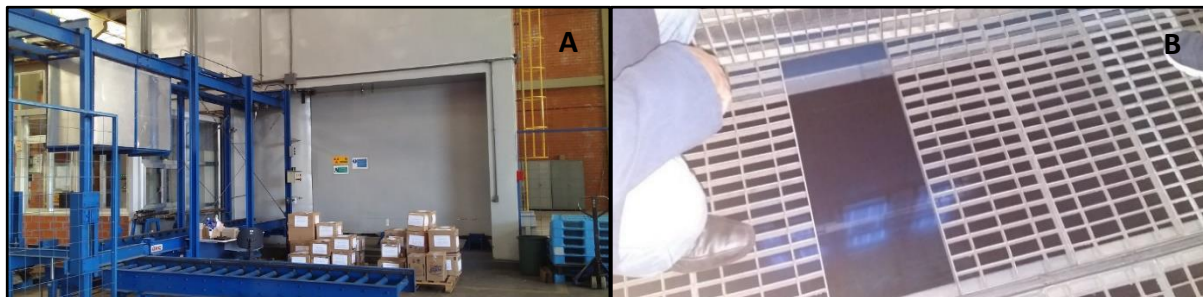
Fonte: Autor (2019)

Figura 3 – Romã ‘Comum’ acondicionada em caixa de papelão revestidas internamente de poliestireno expandido (A e B)



Fonte: Autor (2019)

Figura 4 – Irradiador multipropósito do tipo compacto de raios gama (A e B) do IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP/Campus de São Paulo



Fonte: Autor (2019)

Foram aplicadas as doses: 0,0 kGy (controle); 0,3 kGy; 0,6 kGy; 0,9 kGy; 1,2 kGy e 1,5 kGy. A taxa de dose utilizada foi de 2,59 kGy/h.

Após submetidos às doses de radiação os frutos foram transportados em carro com ar condicionado para o Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP de Botucatu e foram armazenados em câmara fria com temperatura de $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e $90 \pm 5\%$ de UR (PAREEK et al., 2015), analisados a cada 5 dias, durante 30 dias.

2.2.3 Preparo das amostras de polpa e casca de romã

A separação das sementes e da casca foi feita manualmente em ambiente sem luz. A polpa (sarcotesta) (MELGAREJO et al., 2020) foi extraída pela pressão realizada com auxílio de um rolo de massa sobre as sementes. As amostras de polpa e casca de romã foram congeladas em nitrogênio líquido imediatamente após separação e mantidas em freezer com temperatura de -20°C até o momento das análises.

2.2.4 Variáveis analisadas

2.2.4.1 Caracterização centesimal dos frutos

Foi analisada a composição centesimal para a caracterização das amostras de frutos do dia zero, não irradiados.

2.2.4.1.1 Umidade

O teor de umidade da polpa e da casca da romã foi determinado utilizando três repetições, segundo a técnica gravimétrica, com o emprego do calor em estufa à temperatura de 105°C (± 1 °C), até a obtenção de peso constante (BRASIL, 2008). Utilizou-se peso médio de 3 gramas para a polpa e 1,5 gramas para a casca.

2.2.4.1.2 Cinzas

Foram utilizadas em média 3 gramas de polpa e 1,5 gramas de casca de romã para obtenção da porcentagem de cinzas. As amostras foram pesadas e levadas a mufla a 100°C, programado até 550°C por 2 horas. Depois de resfriado, em dissecador, foi pesado e o resultado expresso em porcentagem, conforme metodologia de Brasil (2008).

2.2.4.1.3 Fibra Bruta

Para esta análise foram utilizadas 3 gramas duas gramas de amostras de polpa e casca de romã, com 6 repetições, feita extração continua em aparelho Soxhlet usando éter como solvente, após esta etapa o material foi aquecido em estufa para eliminação do solvente. O resíduo foi transferido para um frasco de digestor de 750 ml, adicionado 200 ml de H₂SO₄ a 1,25% (p/v), ebulição por 30 minutos, depois de filtrado lavado com água quente por duas vezes, a amostra foi devolvida novamente no tubo digestor com 200 ml NaOH 1,25% (p/v), esperada ebulição branda por meia hora, a amostra foi filtrada em papel filtro qualitativo com 500mL de água destilada fervente. O papel filtro com amostra foi levado à estufa de ar forçado a 65 °C por 8 horas. Após resfriado ao dissecador por 2 horas, o material foi pesado. Os resultados foram expressos em porcentagem de fibra bruta (AOAC, 1997), de acordo com a fórmula: $FB (\%) = 100 \times N/P$. Onde FB = fibra bruta; N = n° de g de fibra; e P = n° de g da amostra.

2.2.4.1.4 Lipídeos

A análise de lipídeos foi realizada utilizando-se em média 2,5 gramas de matéria fresca da polpa e casca de romã, com seis repetições, acondicionada em cartucho de papel filtro, seca em estufa a 60 °C. Para extração foi utilizado o aparelho Soxhlet, as amostras adicionadas ao éter foram mantidas sob aquecimento por 8 horas. O balão que aparou o éter no extrator, foi aquecido até a destilação completa, o mesmo, com o resíduo, foi seco em estufa a 105 °C por 8 horas, após resfriado a temperatura ambiente por 2 horas em dessecador, conforme metodologia de AOAC (1997), o balão foi pesado e os resultados expressos em porcentagem de acordo com a fórmula: $100 \times N/P = \text{matéria graxa (\%)} \text{ m/m}$. Onde, N = nº de gramas de matéria graxa e P = no de gramas da amostra.

2.2.4.1.5 Proteína bruta

A determinação da proteína bruta foi realizada pelo processo de digestão Kjeldahl conforme metodologia atual adotada pela Embrapa e descrita no Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Animal e Alimentos (NOGUEIRA; SOUZA, 2005), que consiste de três fases: digestão, destilação e titulação.

2.2.4.1.6 Valor calórico total

O valor calórico total foi calculado com base no teor de proteínas, carboidratos e lipídios das amostras, utilizando os fatores de conversão de Atwater descritos por Mahan e Escott-Stump (2005), conforme a equação: $E \text{ (kcal)} = (\text{proteína} \times 4,0) + (\text{carboidrato} \times 4,0) + (\text{lipídio} \times 9,0)$. Os resultados foram expressos em quilocalorias (kcal).

2.2.4.2 Grupo não destrutivo

2.2.4.2.1 Perda de Massa

A perda de massa foi determinada com auxílio de uma balança semi-analítica (marca Owa labor) com carga máxima 2000 g e divisão de 10 mg. A resultados foram expressos em porcentagem (%) de perda de massa (AOAC, 2005), a partir da equação: $PM (\%) = (P_i - P_j / P_i) \times 100$. Onde, PM = perda de massa (%); P_i = peso inicial do fruto (g); P_j = peso do fruto no período subsequente a P_i (g).

2.2.4.2.2 Taxa de Respiração

A taxa de respiração foi determinada através da quantificação da produção de CO_2 em respirômetro, de acordo com metodologia adaptada de Bleinroth et al. (1976). Pela equação: $TCO_2 = 2,2 \times (V_0 - V_1) \times 10 / P \times T$. Onde, TCO_2 = Taxa de respiração ($ml\ CO_2\ kg^{-1}\ h^{-1}$); V_0 = Volume gasto de HCl para titulação de hidróxido de potássio – padrão antes da absorção de CO_2 (ml); V_1 = Volume gasto de HCl para titulação de hidróxido de potássio após a absorção do CO_2 da respiração (ml); P = peso dos frutos; T = Tempo da respiração; 2,2 = inerente ao equivalente de CO_2 (44/2), multiplicado pela concentração do Ácido clorídrico a $0,1\ mol\ L^{-1}$; 10 = Ajuste para o total de hidróxido de potássio usado na absorção CO_2 (mL).

2.2.4.3 Grupo Destrutivo

2.2.4.3.1 Análise mineral dos frutos

A análise mineral da casca e polpa de romã 'Comum' no dia zero, sem irradiação, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Malavolta et al. (1997).

2.2.4.3.2 Firmeza dos frutos

Com o auxílio do Texturômetro (STEVENS – LFRA Texture Analyser) foi determinado a firmeza dos frutos com profundidade de penetração de 20 mm e velocidade de 2,0 mm/s, utilizando-se a ponteira TA 9/1000. Os valores obtidos para determinar a firmeza em grama-força por centímetro quadrado (gf/cm^2), foram

convertidos em Newton (N). A textura foi realizada em dois pontos distintos na zona equatorial em cada fruto.

2.2.4.3.3 Determinação da cor instrumental para polpa e casca

A cor foi determinada para a casca em três pontos (região equatorial e nas duas extremidades distantes a 3 ± 1 cm da região mediana) em cada fruto ainda inteiro e para a polpa (sarcotesta) da romã extraída manualmente pela compressão das sementes. Foi utilizado o colorímetro da marca Konica Minolta (Chroma meter, CR 400) com leitura direta dos valores de Luminosidade (L^*), ângulo de cor Hue (tonalidade) e Croma (C^*) (MINOLTA, 1998).

2.2.4.3.4 Sólidos solúveis (SS)

Os teores de SS foram determinados por leitura refratométrica direta da polpa da romã, com auxílio do refratômetro digital de mesa (Digital Refractometer DR 202) com ajuste automático de temperatura, com valores expressos em °Brix (AOAC, 2005).

2.2.4.3.5 Acidez titulável (AT)

A AT foi determinada por titulometria com solução padronizada de NaOH a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Utilizou-se 2 g da polpa do fruto de romã homogeneizado, diluída em 100 ml de água deionizada. Os resultados foram expressos em porcentagem (%), conforme metodologia recomendada por Brasil (2008).

2.2.4.3.6 Índice de maturação (Ratio)

O Índice de maturação foi calculado para cada amostra de polpa, pela relação entre o teor de sólidos solúveis e acidez titulável (SS/AT).

2.2.4.3.7 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH foi determinado para a polpa da romã utilizando-se o potenciômetro digital DMPH – 2, conforme metodologia de Brasil (2008).

2.2.4.3.8 Açúcares redutores

A determinação dos teores de açúcares redutores foi realizada por metodologia descrita por Nelson (1944) e adaptada por Somogy (1945). O aparelho utilizado para leitura foi o espectrofotômetro Celm E-225 D, sendo a leitura realizada a 535 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

2.2.4.4 Incidência de doenças

A avaliação da incidência de doenças na romã ‘Comum’ foi realizada de forma subjetiva, visualmente como porcentagem de frutos infectados durante todo o período de armazenamento.

2.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 6 x 7, sendo seis doses de irradiação (0,0 kGy (controle); 0,3 kGy; 0,6 kGy; 0,9 kGy; 1,2 kGy e 1,5 kGy) e sete dias de avaliação (zero, 5, 10, 15, 20, 25 e 30), com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Tukey, $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$. Os resultados foram apresentados em médias com desvio padrão (média $\pm$ DP). As análises foram realizadas pelo software Sisvar versão 5.6 (Lavras, MG, Brasil) e os gráficos foram gerados pelo GraphPad Prism versão 8.0.1 (San Diego, CA, EUA).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela tabela 1 pode-se observar os resultados da composição mineral para a casca e polpa da romã ‘Comum’ obtidos para amostras analisadas apenas no dia zero de armazenamento, sendo estas sem tratamento com radiação gama.

Tabela 1 - Composição mineral da casca e polpa da romã ‘Comum’ no dia zero de armazenamento, sem irradiação

AMOSTRAS	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	----- g kg ⁻¹ -----						----- mg kg ⁻¹ -----				
Casca	10	0,7	11	2	1,2	0,8	19	8	30	38	7
Polpa	0,533	0,116	2,674	0,019	0,053	0,054	-	0,567	0,756	0,454	0,076

Os resultados da composição mineral apontam que entre os macronutrientes, o potássio (K) e o nitrogênio (N) foram os mais abundantes na casca da romã ‘Comum’, e entre os micronutrientes, o manganês (Mn) foi o mineral mais abundante, seguido pelo ferro (Fe) e boro (B). Ranjitha et al. (2018) observaram que os minerais predominantes para a casca de romã em pó foram o cálcio (Ca) (342 mg/100 g de matéria seca), potássio (K) (148,64 mg/100 g de matéria seca), fósforo (P) (118,3 mg/100 g de matéria seca) e sódio (Na) (64,63 mg/100 g de matéria seca).

Para a polpa da romã ‘Comum’ os resultados da composição mineral apontaram que entre os macronutrientes o potássio (K) e o nitrogênio (N) foram mais abundantes, já para os micronutrientes, o ferro (Fe) foi o mais abundante, seguido do cobre (Cu). Estes resultados diferem dos obtidos por Loukhmas et al. (2020) que observaram que o iodo (I) foi o macronutrientes mais abundante no suco de romã, seguido pelo fósforo (P) e enxofre (S) para diferentes cultivares de romãs marroquinas. Outros autores relataram o potássio como o elemento predominante em Romãs ‘Gabsi’ (BOUSSAA et al., 2020), e em vinte cultivares de romã estudadas, cultivadas na Espanha (ALCARAZ-MÁRMOL et al., 2017).

A romã ‘Comum’ pode ser considerada uma fonte de água e potássio, pelos teores observados neste trabalho e segundo Coronado-Reyes et al. (2021) o alto teor de água e potássio da romã, além da baixa concentração de sódio, lhe conferem propriedades diuréticas e purificantes que, junto com sua concentração em ácido cítrico, favorecem a eliminação de ácido úrico e seus sais através da urina.

A composição centesimal e valor calórico da casca e polpa dos frutos de romã ‘Comum’, encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização da romã 'Comum' no dia da colheita para a composição centesimal de Umidade, Cinzas, Lipídeos, Proteína bruta, Fibras, Açúcar redutor e Valor Calórico Total (VCT)

	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Proteína bruta (%)	Fibras (%)	Açúcar Redutor (%)	VCT (Kcal)
Casca	76,12 ±	1,05 ±	0,19 ±	2,47 ±	3,32 ±	6,18 ±	36,32 ±
	2,22	0,15	0,21	0,11	0,25	0,21	1,12
Polpa	88,80 ±	2,68 ±	0,2 ±	0,79 ±	0,0 ±	11,53 ±	51,09 ±
	0,80	0,48	0,05	0,20	0,0	1,22	6,02

A casca e polpa da romã 'Comum' apresentaram alto teor de umidade. Teores de cinzas superiores para a polpa em relação a casca, e porcentagem de lipídeos semelhante para casca e polpa. Proteínas e fibras mostraram-se inferiores para a polpa em comparação com a casca. A porcentagem de açúcares redutores e valor calórico foram superiores para a polpa em relação aos teores da casca para a romã 'Comum'.

De acordo com Smith (2014) os dois principais açúcares das romãs são a frutose e a glicose. Alcaraz-Mármol et al. (2017) relataram estes açúcares como os mais abundantes encontrados nas romãs estudadas, cultivadas na Espanha, o que também foi observado para a romã 'Comum' neste trabalho.

De acordo com Coronado-Reyes et al. (2021) a romã é um fruto constituído com maiores teores de água e açúcares, sendo menor o teor de lipídios e proteínas, ideal para consumo, com baixo poder calórico, proporções estas também observadas para a romã 'Comum'.

Os resultados da ANOVA para as doses de irradiação gama com cobalto 60 (0,0 kGy; 0,3 kGy; 0,6 kGy; 0,9 kGy; 1,2 kGy e 1,5 kGy), dias de armazenamento (zero, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias) e suas interações nos parâmetros de qualidade dos frutos, foram apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) das variáveis com significância das doses de irradiação, dias e a interação destes fatores.

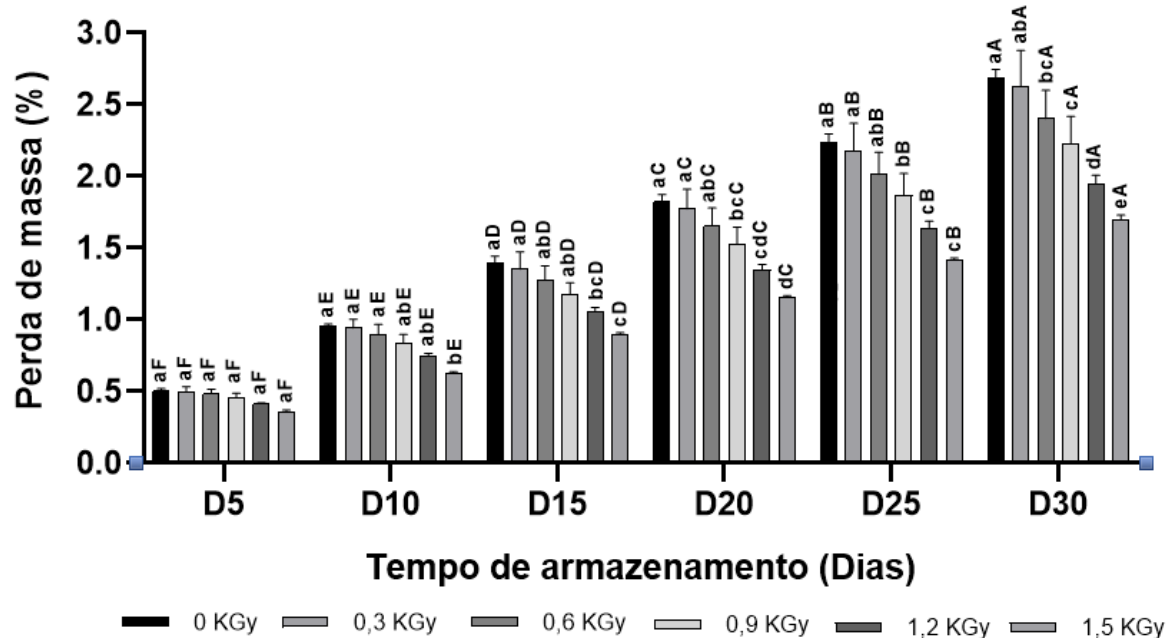
	Doses (kGy)	Dias	Doses x Dias
Perda de massa (%)	**	**	**
Taxa de respiração (ml CO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹)	**	**	**
Firmeza (N)	ns	ns	ns
Luminosidade casca	**	**	ns
°Hue casca	ns	**	ns
Croma casca	*	*	**
Luminosidade polpa	**	**	ns
°Hue polpa	**	**	*
Croma polpa	**	**	**
Sólidos solúveis (°Brix)	*	ns	ns
Acidez titulável (%)	ns	**	*
Ratio (SS/AT)	*	**	*
pH	**	**	ns
Açúcar redutor (%)	*	**	ns

^{ns} não significativo; * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$

Perda de Massa da romã

O efeito da irradiação com raios gama na perda de massa dos frutos, armazenados por 30 dias, pode ser observado na figura 5. Os fatores doses e dias de armazenamento, bem como suas interações influenciaram significativamente a perda de massa.

Figura 5 - Perda de massa (%) da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Entre as doses analisadas, a partir do décimo dia de armazenamento, os frutos não irradiados apresentaram significativamente maior perda de massa em relação aos frutos irradiados com a dose de 1,5 KGy. Ocorreu perda de massa gradual durante o armazenamento, porém com o decorrer do tempo, os frutos submetidos à dose de radiação gama 1,5 kGy apresentaram menor perda de massa (1,70 %). Resultados semelhantes foram obtidos por Lacerda (2020), para frutos de pitaya branca comum (*Hylocereus undatus* Haw.) para as doses de radiação gama 0,6 KGy, 0,9 KGy e 1,2 KGy.

Segundo Prakash e Ornelaz-Paz (2019) em doses toleradas por frutas (<1 kGy), a irradiação causa uma pequena perda de peso, que normalmente não ultrapassa 10% e em doses mais elevadas que 1 kGy, a irradiação pode modificar significativamente a microestrutura dos tecidos vegetais, e consequentemente, suas propriedades de barreira e suscetibilidade à desidratação pós-colheita.

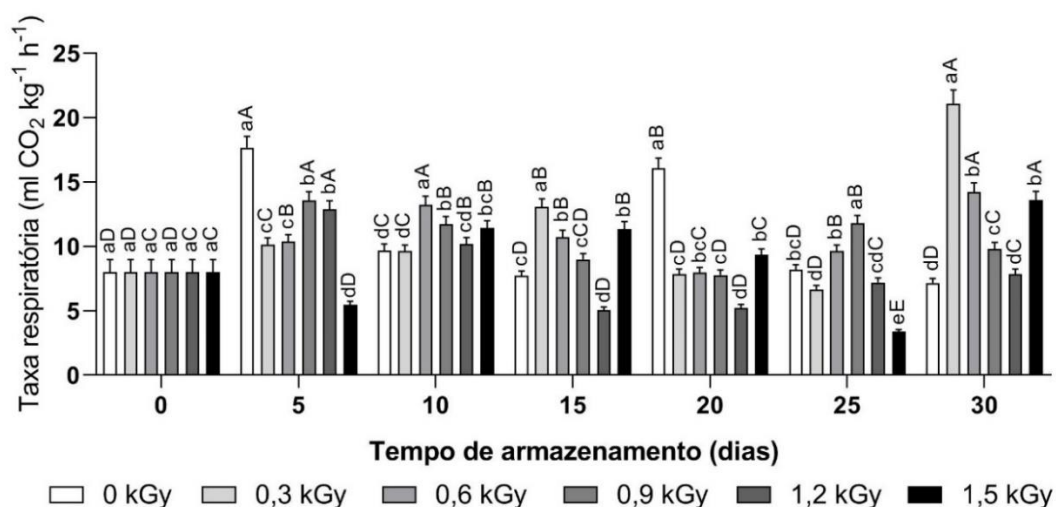
Observou-se que quanto maior a dose de radiação utilizada neste trabalho, menor foi a perda de massa, e o uso da radiação gama, combinado com as

condições de armazenamento (temperatura de $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e $90 \pm 5\%$ de UR), também podem ter colaborado para a menor perda de massa dos frutos, concordando com Prakash e Ornelaz-Paz (2019) que relataram que mediada pela irradiação em frutas e vegetais, a refrigeração após a aplicação da irradiação pode reduzir ou mesmo inibir a perda de peso pós-colheita.

Taxa Respiratória da romã

Pela figura 6 pode-se observar o efeito da radiação gama na taxa respiratória dos frutos ao longo dos dias de armazenamento. Para esta variável ocorreu diferença significativa para as doses, dias de armazenamento e houve interação entre os fatores.

Figura 6 - Taxa respiratória ($\text{ml CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $90 \pm 5\%$ por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Ocorreram variações na taxa respiratória para todas as doses e dias de armazenamento, sendo que a dose 0,3 KGy no dia 30 apresentou o maior valor ($21,10 \text{ ml CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e os tratamentos, com dose 1,2 KGy ($7,85 \text{ ml CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e controle ($7,16 \text{ ml CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) apresentaram os menores valores para esta variável.

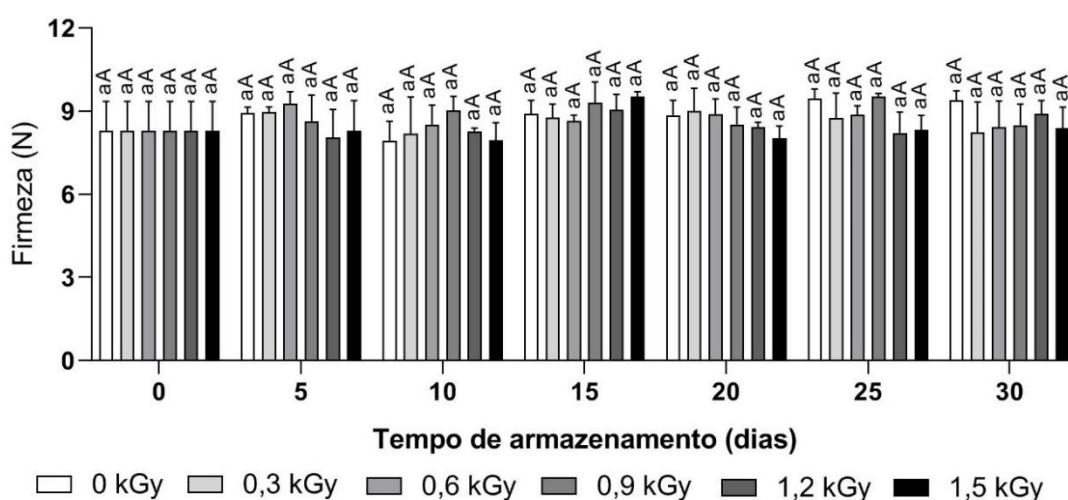
Esta variação na taxa respiratória pode ter ocorrido em função do estresse gerado pela irradiação.

De acordo com Smith (2014) as romãs são frutas não climatéricas e amadurecem sem uma acentuada produção de etileno e aumento na respiração celular. Segundo Holland et al. (2009) depois que a romã é colhida, ela continua respirando a uma taxa relativamente baixa. Essa taxa diminui com o tempo após a colheita e o armazenamento em baixa temperatura pode manter a taxa de respiração abaixo de 8 ml de CO₂/kg/min. Mesmo com as variações observadas, a taxa respiratória da romã 'Comum' manteve-se baixa e menor que a relatada pelos autores supracitados, o que está relacionado ao fato de a romã ser uma fruta não climatérica.

Firmeza dos frutos

Pode-se observar pela figura 7 a firmeza dos frutos submetidos a radiação gama. Para esta variável não ocorreu diferença significativa para as doses, dias de armazenamento e não houve interação entre os fatores. Os frutos não sofreram alteração da firmeza.

Figura 7 - Firmeza (N) da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Resultado semelhante foi obtido por Golding et al. (2015), que ao irradiar frutos de maracujá (*Passiflora edulis*, cultivar “Sweetheart”) com radiação gama (0, 150, 400 e 1000 Gy), observaram que a irradiação não afetou a firmeza dos frutos.

Pareek et al. (2015) relataram que um dos principais problemas associados à fruta da romã é a perda excessiva de peso, o que pode resultar no endurecimento da casca. Desta forma a manutenção da firmeza dos frutos pode estar associada com a baixa perda de massa influenciada pela irradiação, observada neste trabalho para a romã ‘Comum’.

Por outro lado, a casca de romã é rica em conteúdo de pectina (ZHUANG et al., 2019), desta forma provavelmente as doses utilizadas neste trabalho não foram suficientes para a ativação de enzimas que influenciam a firmeza, já que Jain et al. (2017), relataram que a degradação da pectina e de outros polissacarídeos estruturais, causam a quebra da lamela média na parede celular, reduzindo a firmeza, podendo ser acelerados pela radiação, que pode induzir a atividade dos radicais livres, bem como o aumento da atividade das enzimas poligalacturonase e pectinametilesterase.

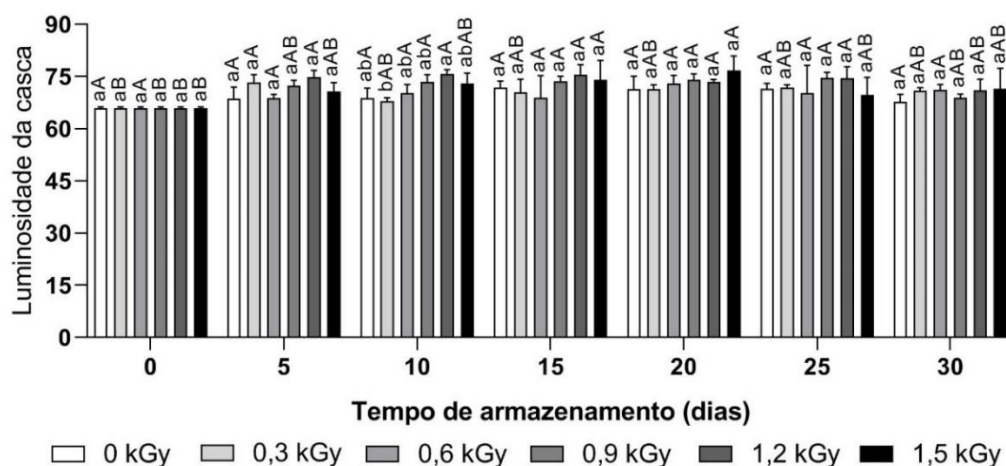
Cor da casca e polpa dos frutos

De acordo com Yusef et al. (2020) a coordenada L^* , mensura cores claras e escuras, o Ângulo Hue indica cores puras ou misturadas e croma (C^*) define a saturação da cor.

Em relação à luminosidade da casca (L^*) (Figura 8), ocorreu diferença significativa para as doses, dias de armazenamento e não houve interação entre os fatores. Para o ângulo Hue da casca (Figura 9), ocorreu diferença significativa para os dias de armazenamento. Já o croma (C^*) (Figura 10) para a casca apresentou diferença significativa para as doses, dias de armazenamento e houve interação entre os fatores.

Entre as doses, a luminosidade da casca (Figura 8) foi maior para os frutos irradiados com 1,2 KGy (75,66) e menor para os frutos irradiados com 0,3 KGy (67,82) no dia 10. Já os frutos não irradiados e a dose 0,6 KGy não alteraram a luminosidade da casca ao longo dos dias armazenados.

Figura 8 - Luminosidade da casca da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



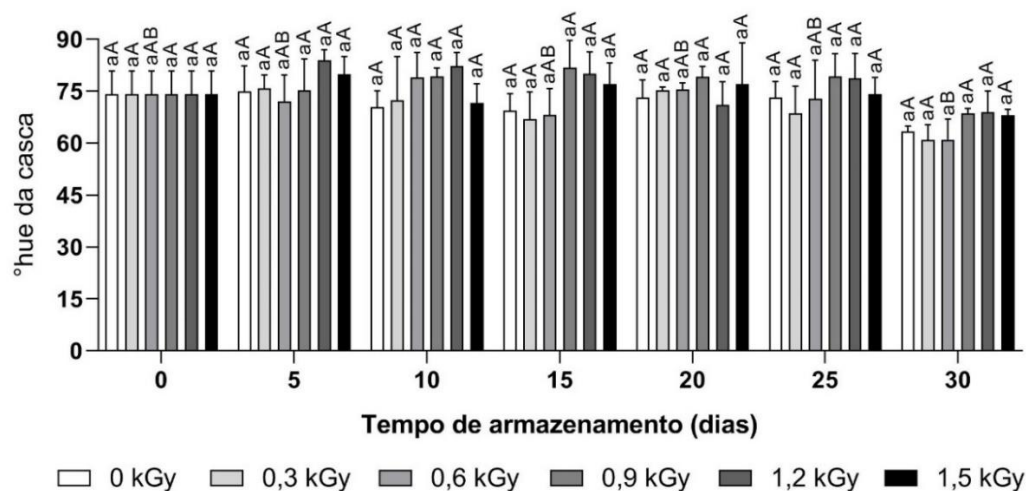
Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Segundo Prakash e Ornelaz-Paz (2019) quando irradiados, normalmente a cor externa se torna mais escura e mais intensa do que a dos frutos não irradiados. O que não foi observado para a casca da romã 'Comum', já que apresentaram a tendência de aumento da luminosidade com a irradiação, tornando mais claras ao longo do armazenamento.

A alteração do ângulo Hue (Figura 9) foi observado ao longo dos dias de armazenamento apenas para a dose 0,6 KGy de radiação gama, apresentando o maior valor no dia 10 (79,00) e menor valor no dia 30 (61,00) de armazenamento, porém permaneceram dentro da coloração laranja.

De acordo com Coronado-Reyes et al. (2021) a diminuição do ângulo indica que houve uma maior síntese de metabólitos na casca que servem ao fruto como defesa, fato observado apenas para a dose 0,6 KGy.

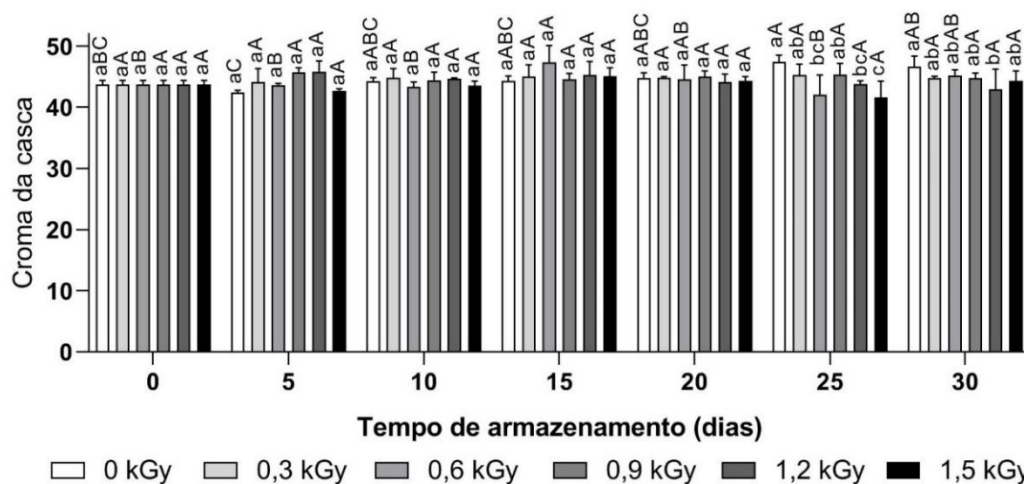
Figura 9 – Ângulo Hue da casca da romã ‘Comum’ irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Entre as doses verificou-se que os frutos não irradiados apresentaram maiores valores para o croma da casca no dia 25 e 30, apresentando desta forma maior intensidade de cor (Figura 10). A cromaticidade da casca para as doses 0,3 KGy, 0,9 KGy, 1,2 KGy e 1,5 KGy não sofreram alterações durante todo o período de armazenamento.

Figura 10 - Croma da casca da romã ‘Comum’ irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias

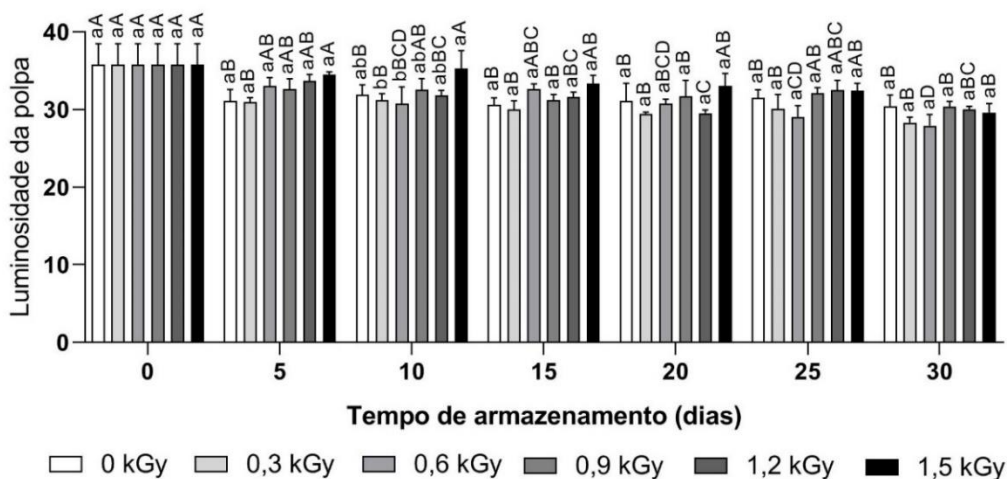


Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Para a luminosidade da polpa (L^*) da romã ‘Comum’ (Figura 11), ângulo Hue (Figura 12) e croma (C^*) (Figura 13) ocorreram diferenças significativas para as doses e dias de armazenamento, não havendo interação entre os fatores apenas para a luminosidade.

Entre as doses estudadas a luminosidade da polpa da romã foi maior para 1,5 KGy (35,27) e menor para as doses 0,3 KGy (31,24) e 0,6 KGy (30,76) no dia 10 de armazenamento (Figura 11).

Figura 11 - Luminosidade da polpa da romã ‘Comum’ irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



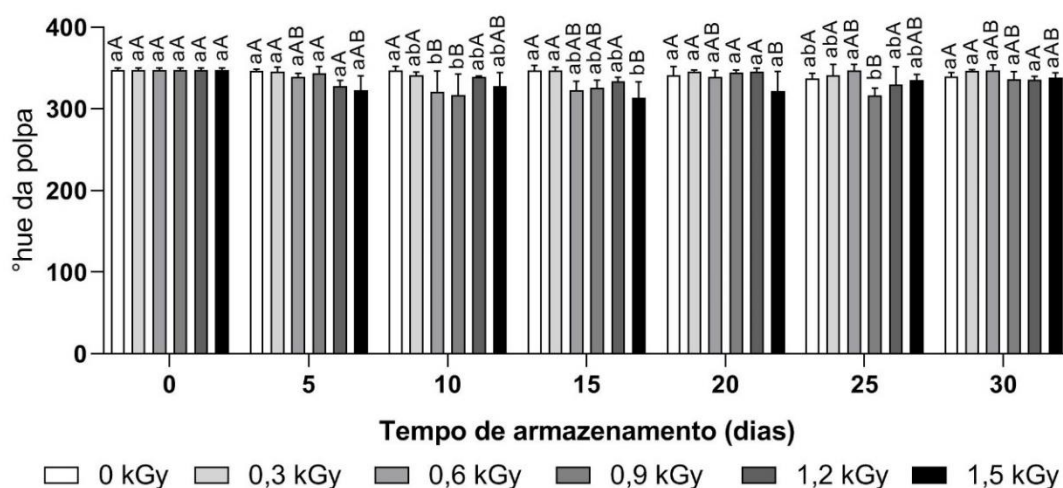
Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

A dose de radiação gama de 1,5 KGy apresentou a menor alteração da luminosidade da polpa, ao longo de todo o período de armazenamento. Ao final do período de armazenamento todas as doses apresentaram menores valores para luminosidade, caracterizando polpas mais escuras. Resultados diferentes foram observados por Pourebrahimi et al. (2020) ao avaliar a polpa da romã irradiadas, observaram aumento significativo nos valores L^* em todos os tratamentos durante o armazenamento.

O ângulo Hue para a polpa de romã (Figura 12) não sofreu alteração ao longo de todo o período de armazenamento para os frutos não irradiados e para as doses 0,3 KGy e 1,2 KGy. A dose 1,5 KGy apresentou o menor valor (317,3) para o ângulo

Hue entre as doses, apenas no dia 15. Porém no início e ao final do armazenamento os frutos para todas as doses apresentaram coloração entre violeta e vermelho-violeta.

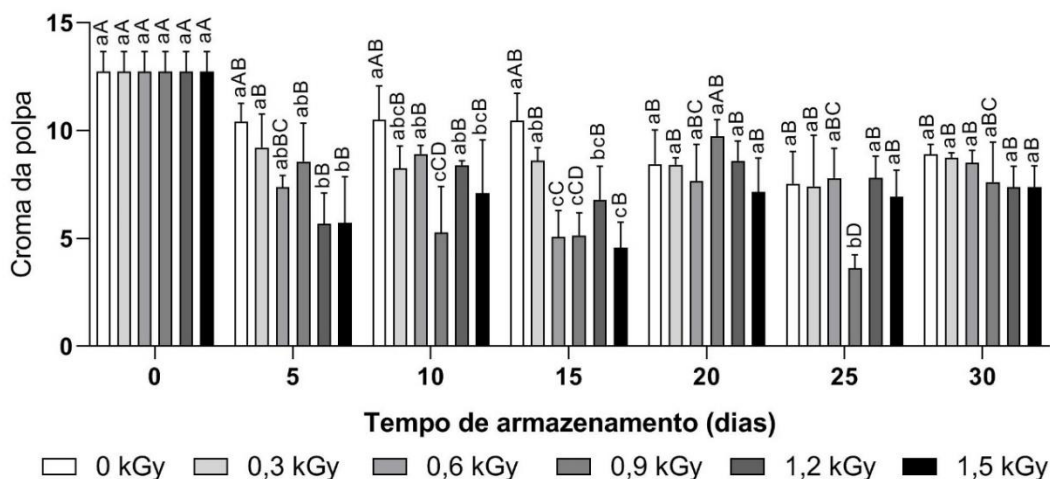
Figura 12 – Ângulo Hue (h°) da polpa da romã ‘Comum’ irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Para o croma da polpa (Figura 13), observa-se que já no dia 5 os frutos não irradiados (10,42) e irradiados com 0,3 KGy (9,22) apresentaram os maiores valores e os menores valores foram observados para os frutos irradiados com 1,2 KGy (5,68) e 1,5 KGy (5,73), com redução da intensidade de cor, pela provável degradação de antocianinas causada pelas doses mais altas. Ao final do armazenamento foi possível observar menor intensidade de cor da polpa, independentemente da dose utilizada, com possível degradação de antocianina.

Figura 13 - Croma da polpa da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

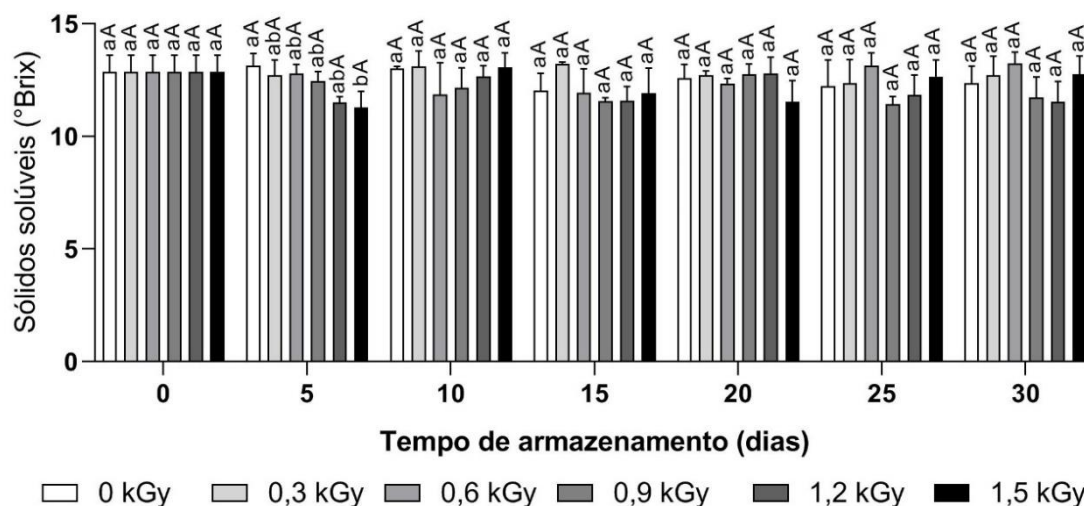
De acordo com Holland et al. (2009) não há correlação entre a cor da casca e a cor das sementes. Essas cores podem ser muito diferentes ou semelhantes, dependendo da variedade. A cor externa não indica a extensão do grau de amadurecimento da fruta ou a sua prontidão para o consumo, pois pode atingir sua cor final muito antes das sementes estarem completamente maduras.

É importante investigar possíveis mudanças na cor da casca e da polpa da romã já que a irradiação pode resultar na degradação de pigmentos, sendo que a cor da polpa da romã é um importante atributo de qualidade e de acordo com Kahramanoğlu e Usanmaz (2016), apenas a aparência externa é suficiente para a redução do valor comercial.

Sólidos solúveis (°Brix), acidez titulável (%), índice de maturação (*Ratio*) e pH para polpa

Os teores de sólidos solúveis para a polpa da romã 'Comum' apresentaram diferença significativa apenas entre as doses, sendo esta diferença observada para o dia 5, quando os frutos não irradiados apresentaram o maior teor de SS (13,33 °Brix) e a dose 1,5 kGy o menor teor (11,30 °Brix) (Figura 14).

Figura 14 - Sólidos Solúveis (°Brix) da polpa da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



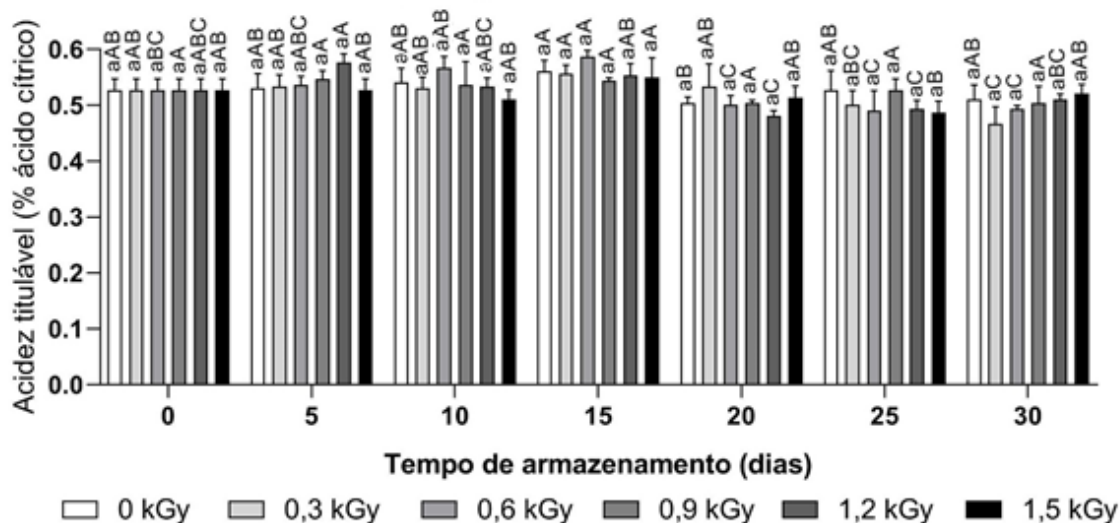
Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

A diferença observada para sólidos solúveis entre as doses apenas para o dia 5 pode estar associada ao grau de maturação desses frutos, porém segundo Kahramanoğlu e Usanmaz (2016) é possível que ocorra diminuição do conteúdo de sólidos solúveis dos frutos com a concentração de açúcar pela perda umidade durante o armazenamento, bem como pela degradação dos açúcares com o prolongamento do período de armazenamento, o que não foi observado neste trabalho.

Shahbaz et al. (2014) estudaram a aplicação de diferentes doses de irradiação gama (0,4; 1 e 2 kGy) em frutas frescas de romã e seu efeito nas características químicas e sensoriais, e observaram que os teores de sólidos solúveis permaneceram inalterados até o tratamento de 1 kGy. Já Pourebrahimi et al. (2020) observaram aumento significativo para o teor de sólidos solúveis após o 20º dia de armazenamento em polpas de sementes de romã irradiadas de 0 até 2 kGy, armazenadas em geladeira (4º C), sendo o maior teor observado em sementes não irradiadas.

De acordo com Smith (2014) o ácido cítrico é o mais abundante em quase todas as cultivares de romã. Para a acidez titulável da polpa da romã 'Comum' (Figura 15) não houve diferença estatística entre as doses. A acidez titulável não sofreu alteração durante todo o período de armazenamento apenas para a dose de radiação gama 0,9 KGy.

Figura 15 - Acidez titulável (%) da polpa da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias

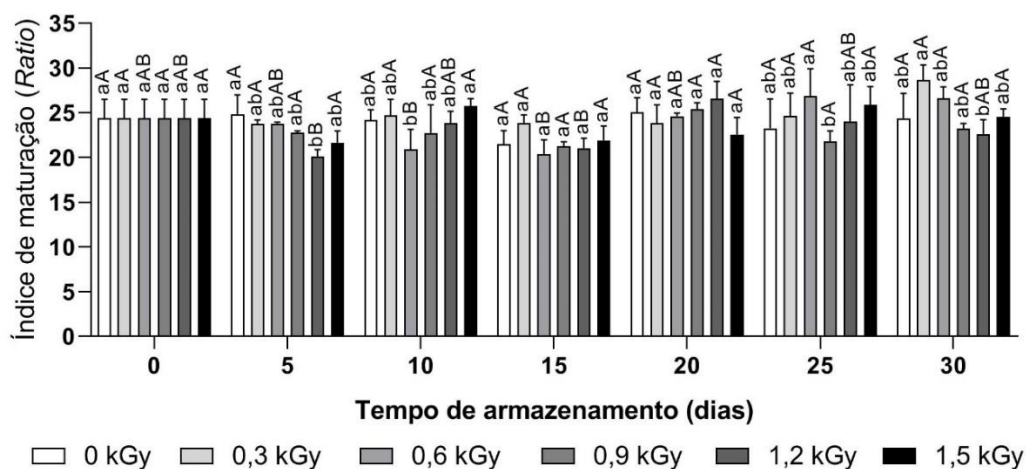


Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Prakash e Ornelaz-Paz (2019) relataram que a irradiação de baixa dose normalmente tem pouco efeito sobre a acidez titulável e ácidos orgânicos individuais, o que corrobora com Shahbaz et al. (2014) que observaram acidez titulável inalteradas até o tratamento de 1 kGy em frutas frescas de romã. Já Pourebrahimi et al. (2020) observaram menor tendência de redução da acidez titulável em polpa de sementes irradiadas com 3 kGy do que para as doses 0 a 2 kGy durante 20 dias de armazenamento a 4 °C.

O índice de maturação (Ratio) é definido pela razão entre o nível de açúcares, determinando a doçura, e os ácidos orgânicos, determinando a acidez. Para o índice de maturação houve interação significativa entre os fatores, diferença estatística para as doses de radiação gama e para os dias de armazenamento (Figura 16).

Figura 16 - Índice de maturação da polpa da romã ‘Comum’ irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

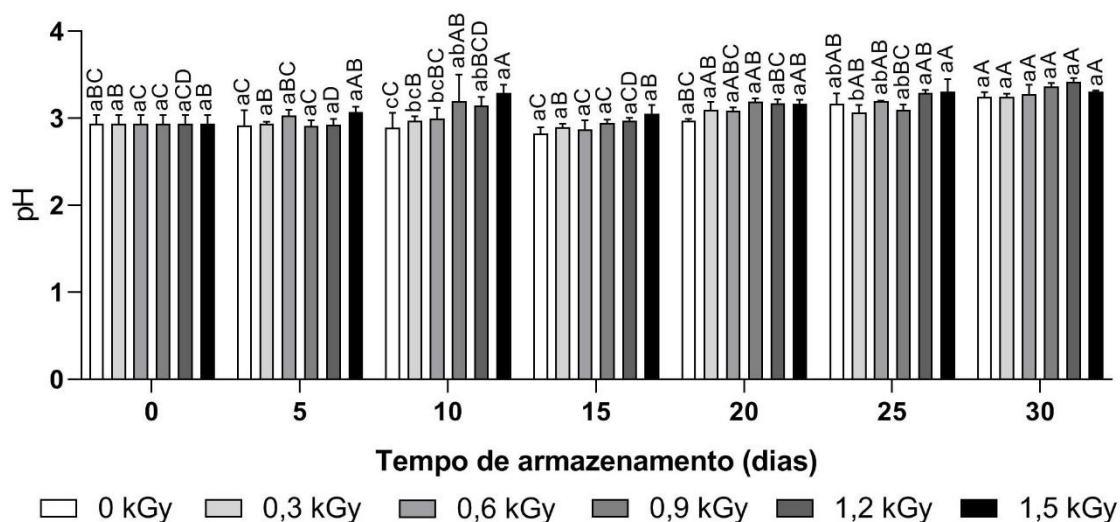
Os menores valores para o índice de maturação, entre as doses utilizadas foram observadas para 1,2 KGy, 0,6 KGy, 0,9 KGy e 1,2 KGy para os dias 5, 10, 25 e 30, respectivamente. Estes resultados podem estar associados ao maior teor de acidez encontrados nestes frutos.

Ao longo dos dias armazenados observou-se que o índice de maturação sofreu alteração apenas para as doses de 0,6 KGy e 1,2 KGy. No entanto para todas as doses, durante o armazenamento, estes valores para a romã ‘Comum’ mantiveram acima de 13, que segundo Kahramanoğlu e Usanmaz (2016) é o índice de maturação preferível para romã.

Para a variável pH da polpa da romã ‘Comum’ (Figura 17) ocorreu diferença estatística para doses e dias de armazenamento. Entre as doses de irradiação ocorreram diferenças significativas para pH nos dias 10 e 25. Para o período de armazenamento analisado, foi observado pequeno incremento nos valores de pH

para todos os tratamentos, sendo que os maiores valores para todos os tratamentos foram observados para no dia 30.

Figura 17 - pH da polpa da romã ‘Comum’ irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

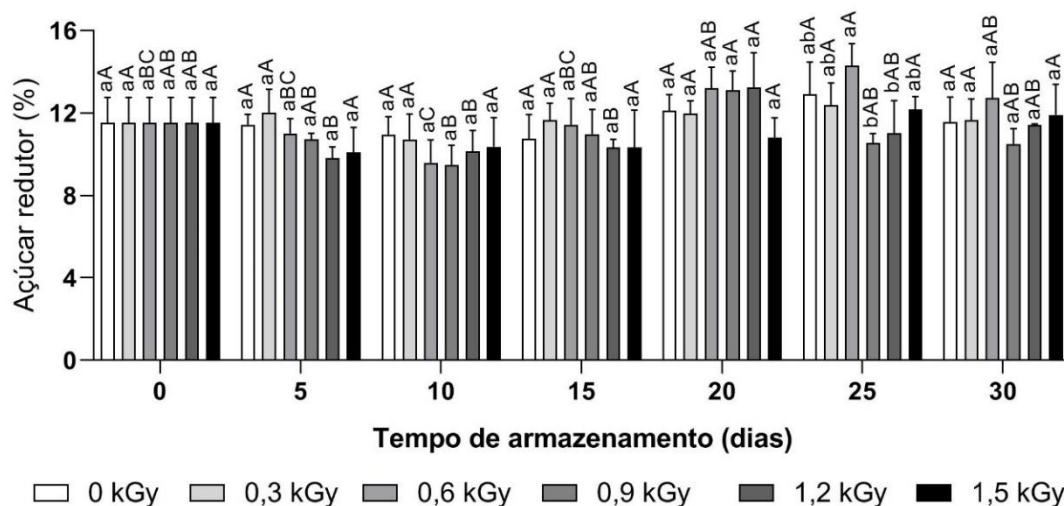
Ao avaliar a aplicação de irradiação gama nas doses de 0,4; 1 e 2 kGy em frutas frescas de romã, Shahbaz et al. (2014) relataram que os valores de pH permaneceram inalterados até a dose de 1 kGy.

De acordo com Kandyliis e Kokkinomagoulos (2020) a romã apresenta valores baixos para pH (geralmente $<4,0$), como os observados para a romã ‘Comum’. E segundo ainda estes autores o pH é dependente do cultivar, condição do solo, clima, estágio de maturação, técnicas de cultivo, condições de processamento e condições de armazenamento.

Açúcares da polpa de romã

Para a variável açúcar redutor ocorreu diferença significativa para as doses e para os dias de armazenamento e não houve interação entre os fatores (Figura 18).

Figura 18 - Açúcar redutor (%) da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Para as doses verificou-se diferença estatística apenas no dia 25, sendo a maior porcentagem de açúcares redutores para a dose 0,6 KGy (14,31%) e as menores porcentagens para as doses 1,2 KGy (11,03%), seguida da dose 0,9 KGy (10,54%). Ao longo do armazenamento o teor de açúcares redutores não sofreram alterações para os frutos não irradiados e para os frutos que receberam as doses 0,3 KGy e 1,5 KGy de radiação gama.

De Segundo Prakash e Ornelaz-Paz (2019) mudanças mediadas por irradiação em açúcares individuais são pequenas e doses muito baixas (0,075 e 0,3 kGy) não alteram o conteúdo de glicose, frutose e sacarose em limões, pepinos, nectarinas, mamões, caquis, abobrinhas, porém doses ligeiramente mais altas (1 kGy) não alteram o conteúdo de açúcares individuais nos pomelos. De acordo ainda com estes autores foi demonstrado que a irradiação promove a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo dos açúcares.

Incidência de doenças

Não foi observada incidência de doenças na romã 'Comum' utilizada neste trabalho. Porém segundo Suzuki (2016) os produtores evidenciam as doenças como

o fator mais prejudicial e limitante da cultura. Ainda segundo este autor, sem referências científicas sobre o tema, os produtores citam a antracnose (*Colletotrichum* sp.) como a doença de maior prejuízo pela redução ou impossibilidade de comercialização dos frutos, assim como a podridão do fruto (*Botrytis* sp.), porém com menores prejuízos.

Para os frutos irradiados com radiação gama, a ação direta sobre os agentes patogênicos e a combinação da radiação com o armazenamento refrigerado (temperatura de $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e $90 \pm 5\%$ de UR) podem ter influenciado a não incidência de doenças durante todo o período de armazenamento, bem como a refrigeração para os frutos não irradiados.

As boas condições de sanidade dos frutos utilizados, também podem ter contribuído para a não incidência de doenças. De acordo com Suzuki (2016) para o cultivo de romã 'Comum' são utilizados fungicidas sistêmicos e segundo Shimizu et al. (2020) a incidência e a severidade de manchas em frutos de romã em condições de campo têm relação direta com a incidência de fungos na pós-colheita.

2.4 CONCLUSÕES

Nas condições em que o presente trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

- A irradiação na dose 1,5 KGy associada a refrigeração reduziu a perda de massa dos frutos.
- O uso da irradiação não alterou a firmeza dos frutos, o ângulo de cor Hue da casca e a acidez titulável da polpa.
- Foi verificado para todas as doses de radiação gama e para a testemunha que a refrigeração foi efetiva na perda de massa.

REFERÊNCIAS

- ALCARAZ-MÁRMOL, F. *et al.* Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing. **Scientia Horticulturae**, v. 219, p. 152-160, 2017.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of **AOAC international In Fruits juices**. 16ª edição, v. 2, Maryland, 1997.p 37.1 -23.
- AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemistry international. 18. ed. Gaithersburg: **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY**, 2005.
- BAR-YA'AKOV, I. *et al.* Primary Metabolites, Anthocyanins, and Hydrolyzable Tannins in the Pomegranate Fruit. **Frontiers in Plant Science**. v. 10, p. 1 – 19, 2019.
- BEAUVOIT, B. *et al.* Putting primary metabolism into perspective to obtain better fruits. **Annals of Botany**, v. 122, p. 1-21, 2018.
- BOUSSAA, F. *et al.* Growing Location Affects Physical Properties, Bioactive Compounds, and Antioxidant Activity of Pomegranate Fruit (*Punica granatum* L. var. Gabsi). **International Journal of Fruit Science**, v. 20, p. 508-523, 2020.
- BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físicos e químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.
- CORONADO-REYES, J. A. *et al.* Chemical composition and great applications to the fruit of the pomegranate (*Punica granatum*): a review. **Food Science and Technology**, p. 1-8, 2021.
- CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. (Eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. p. 1250-1318. 2000.
- DE LA ROSA, L. A. *et al.* Phenolic Compounds. In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**. Woodhead Publishing, 2019, p. 253-271.
- EUSTICE, R. F. Novel processing technologies: facts about irradiation and other Technologies. In: ANDERSEN, V. **Genetically Modified and Irradiated Food**, 2020, p. 269-286.

GOLDING, J. B. *et al.* Low Dose Gamma Irradiation Does Not Affect the Quality or Total Ascorbic Acid Concentration of “Sweetheart” Passionfruit (*Passiflora edulis*). **Foods**, v. 4, p. 376-390, 2015.

HOLLAND, D. *et al.* Pomegranate: Botany, horticulture, breeding. *Horticultural Reviews*, v. 35. P. 127–191, 2009.

JAIN, A. *et al.* Research Paper Effect of phytosanitary irradiation on the quality of two varieties of pummelos (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.). **Scientia Horticulturae**, v. 217, p. 36-47, 2017.

KANDYLIS, P.; KOKKINOMAGOULOS, E. Food Applications and Potential Health Benefits of Pomegranate and its Derivatives. **Foods**, v. 9, p. 1-21, 2020.

KAHRAMANOGULU, I; USANMAZ, S. **Pomegranate production and marketing**. 1. ed. CRC Press, Boca Raton, 2016. 148p.

KUMAR, R. *et al.* Production Technology of Pomegranate in Arid Region. Central Institute for arid horticulture. Technical Bulletin Nº 65, 2018, 25p.

LACERDA, V. R. **Irradiação gama na pós-colheita dos frutos de pitaya vermelha de polpa branca**. 2020. f. 99. Dissertação (mestrado em Agronomia - Horticultura). – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2020.

LOUKHMAS, S. *et al.* Assessment of Minerals, Bioactive Compounds, and Antioxidant Activity of Ten Moroccan Pomegranate Cultivars. **Journal of Food Quality**, v. 2020, p. 1-10, 2020.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; DE OLIVEIRA, S.A. Avaliação do Estado Nutricional das Plantas: princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MAHAN, L. K., ESCOTT-STUMP S. Alimentos, nutrição & dietoterapia. 11. ed. São Paulo: Roca; 2005.

MELGAREJO, P. *et al.* Pomegranate (*Punica granatum* L.) a dry pericarp fruit with fleshy seeds. **Trends in Food Science & Technology**, v. 102, p 232–236, 2020.

MINOLTA, K. **Comunicação precisa da cor: controle de qualidade da percepção à instrumentação**. 1998. 59 p.

MOREIRA, I. S. *et al.* A. Biometria e componentes físico-químicos de romã armazenada sob refrigeração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 2, p. 209-215, 2015.

NELSON, N. A photometric of the Somogy method for the determination of glucose. **Journal Biol. Chemistry**, Bethesda, n.153, p. 375-380, 1944.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos. São Carlos: **Embrapa Pecuária Sudeste**, 2005. 313p.

PAREEK, S.; VALERO, D.; SERRANO, M. Postharvest biology and technology of pomegranate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 95, p. 2360–2379, 2015.

POTT, D. M. *et al.* An Overview of Some Secondary Compounds Derived From the Primary Metabolism for Their Role in Conferring Nutritional and Organoleptic Characteristics to Fruit. **Frontiers in Plant Science**. v. 10 , p.1–19, 2019.

POUREBRAHIMI, Y. *et al.* Effect of Gamma Irradiation on the Quality Characteristics and Shelf Life of Pomegranate Arils during Refrigerated Storage. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 22, p. 723-735, 2020.

PRAKASH, A; ORNELAS-PAZ, J. J. Irradiation of Fruits and Vegetables. In: **Postharvest Technology of Perishable Horticultural Commodities**. Woodhead Publishing, 2019. p. 563-589.

RANJITHA, J. *et al.* Nutritional composition of fresh pomegranate peel poder. **International Journal of Chemical Studies**, v. 6, p. 692-696, 2018.

SHAHBAZ, H. M. *et al.* Chemical and sensory quality of fresh pomegranate fruits exposed to gamma radiation as quarantine treatment. **Food Chemistry**, v. 145, p. 312–318, 2014.

SHIMIZU, G. D. Control of spot on pomegranate fruit in field and phytosanitary quality during postharvest. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.15, n.3, e8218, 2020.

SHULMAN, Y. *et al.* Pomegranate fruit development and maturation. **Journal of Horticultural Science**, v. 59, p. 265-274, 1984.

SILVA, A. L. F; ROZA, C. R. USO DA IRRADIAÇÃO EM ALIMENTOS: REVISÃO. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 28, n. 1, p. 49-56, 2010.

SMITH, R. E. Pomegranate: botany, postharvest treatment, biochemical composition and health effects. Nova Science Publishers, 2014, 176 p.

SOMOGYI, M. Determination of blood sugar. **Journal Biological Chemistry**, Bethesda, v. 160, p. 69-73, 1945.

SUZUKI, E. T. **Avaliação fenológica, análise econômica e estudo da cadeia produtiva da romã (*Punica granatum*)**. 2016. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

VÁZQUEZ-ARAÚJO, L. *et al.* Physicochemical and descriptive sensory characterization of Spanish pomegranates: aptitudes for processing and fresh

consumption. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 7, p. 1663–1672, 2014.

VIEITES, R. L. Conservação pós-colheita de frutos com a utilização da irradiação. In: NEVES, L. C. (org.). **Manual pós-colheita da fruticultura brasileira**. Londrina: EDUEL, 2009. p. 189-212.

ZHUANG, H. *et al.* Study on the Emulsifying Properties of Pomegranate Peel Pectin from Different Cultivation Areas. **Molecules**, v. 24, 1819, 2019.

WU, S.; TIAN, L. Diverse Phytochemicals and Bioactivities in the Ancient Fruit and Modern Functional Food Pomegranate (*Punica granatum*). **Molecules** v. 22, p. 1- 17. 2017.

YOUSEF, A. R. M. *et al.* Cultivated area characteristics on wonderful pomegranate fruits quality under cold storage conditions. **Plant Archives**, v. 20, p. 3131-3139, 2020.

CAPÍTULO 3

RADIAÇÃO GAMA NA BIOSÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA ROMÃ 'COMUM'

RESUMO

O uso de radiação gama em pós-colheita de frutas, pode ativar seu sistema de defesa, induzindo o estresse oxidativo, que envolve a síntese de metabólitos secundários antioxidantes como os compostos fenólicos, que são de grande interesse por causa dos benefícios a saúde, podendo ser uma alternativa pós-colheita de romã. Objetivou-se com o presente estudo avaliar a influência da utilização de raios gama na biossíntese e manutenção de compostos bioativos em pós-colheita de romã 'Comum'. Os frutos foram colhidos no município de Alvares Machado, SP. Foram selecionados e embalados no laboratório de Frutas e Hortaliças do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP de Botucatu e acondicionados em caixas de papelão revestidas internamente de poliestireno expandido e encaminhados para o Centro de Tecnologia das Radiações - CTR - do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN - USP/Campus de São Paulo, onde foram submetidos a doses de irradiação com cobalto (^{60}Co). Os frutos foram armazenados em câmara fria ($10 \pm 1^\circ\text{C}$ e $90 \pm 5\%$ de UR), durante 30 dias. Foram realizadas análises bioquímicas da polpa e casca dos frutos. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 6×7 , sendo seis doses de irradiação (0,0 kGy (controle); 0,3 kGy; 0,6 kGy; 0,9 kGy; 1,2 kGy e 1,5 kGy) e sete dias de avaliação (zero, 5, 10, 15, 20, 25 e 30), com três repetições. A irradiação foi eficiente na síntese de compostos bioativos. As doses de radiação gama 0,3 KGy e 0,6 KGy aumentaram o conteúdo de antocianina monomérica total da polpa da romã 'Comum' ao longo do armazenamento. A radiação gama na dose 0,6 KGy aumentou a atividade antioxidante da casca. A dose de 1,5 KGy promoveu aumento no conteúdo de compostos fenólicos totais e manteve a atividade antioxidante da polpa da romã ao final do armazenamento.

Palavras-chave: *Punica granatum* L.; irradiação; metabolismo secundário; fitoquímicos; antioxidantes.

ABSTRACT

The use of gamma radiation in post-harvest fruit can activate its defense system, inducing oxidative stress, which involves the synthesis of antioxidant secondary metabolites such as phenolic compounds, which are of great interest because of health benefits, which may be a pomegranate post-harvest alternative. The objective of the present study was to evaluate the influence of the use of gamma rays on the biosynthesis and maintenance of bioactive compounds in postharvest of 'Comum' pomegranate. The fruits were harvested in the municipality of Alvares Machado, SP. They were selected and packaged in the Fruits and Vegetables laboratory of the Vegetable Production Department of FCA/UNESP in Botucatu and packed in cardboard boxes internally lined with expanded polystyrene and sent to the Radiation Technology Center - CTR - of the Research Institute Energéticas e Nucleares - IPEN - USP/Campus de São Paulo, where they were submitted to cobalto (^{60}Co) irradiation doses. The fruits were stored in a cold chamber ($10 \pm 1^\circ\text{C}$ and $90 \pm 5\%$ RH) for 30 days. Biochemical analyzes of the pulp and peel of the fruits were carried out. The experimental design was completely randomized (DIC) in a 6×7 factorial scheme, with six irradiation doses (0.0 kGy (control); 0.3 kGy; 0.6 kGy; 0.9 kGy; 1.2 kGy and 1.5 kGy) and seven days of evaluation (zero, 5, 10, 15, 20, 25 and 30), with three repetitions. Irradiation was efficient in the synthesis of bioactive compounds. Gamma radiation doses of 0.3 KGy and 0.6 KGy increased the total monomeric anthocyanin content of 'Comum' pomegranate pulp during storage. Gamma radiation at a dose of 0.6 KGy increased the antioxidant activity of the peel. The dose of 1.5 KGy increased the content of total phenolic compounds and maintained the antioxidant activity of the pomegranate pulp at the end of storage.

Keywords: *Punica granatum* L.; irradiation; secondary metabolism; phytochemicals; antioxidants.

3.1 INTRODUÇÃO

A romã (*Punica granatum* L.) aumentou em popularidade e interesse por causa dos benefícios a saúde pelo consumo da fruta e seus derivados (ZAOUAY et al., 2012). Podendo ser considerada um alimento funcional, a romã é capaz de promover a manutenção de um bom estado de saúde. Possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórios, antienvelhecimento, prebióticos, anticancerígenos, papel protetor contra distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares e fitocompostos que podem prevenir o desenvolvimento de várias doenças crônicas (LAVORO et al., 2021). De acordo com Kalaycioglu e Erim (2017) a principal causa do efeito positivo da romã para a saúde é a sua atividade antioxidante.

Segundo Melgarejo-Sánchez et al. (2021) a identificação da capacidade bioativa das diferentes partes da romã é muito importante, pois os consumidores possuem distintos hábitos alimentares, bem como para que seu uso possa ser potencializado em diversos setores, como farmacêutico, alimentício e cosmético. Segundo Pathak et al. (2017) a casca da romã é fonte de compostos bioativos valiosos, muitos dos quais podem ser convertidos em produtos de valor agregado. García et al. (2021) relataram que os subprodutos da romã possuem valor agregado como fonte de compostos bioativos, demonstrando potencial para o desenvolvimento de novos aditivos alimentares e redução do desperdício na indústria agroalimentar.

A romã é uma importante fonte de compostos fenólicos (RUSSO et al., 2018), sendo estes metabólitos secundários, e segundo Pott et al. (2019) estes compostos são produzidos principalmente através das vias do chiquimato e do fenilpropanóide, sendo os principais compostos contribuintes para as respostas das plantas a estresses bióticos e abióticos. Estes metabólitos também são responsáveis pelos produtos químicos bioativos com ações medicinais em humanos (YAHIA, 2019).

Existem mais de 8.000 compostos fenólicos, com grande variabilidade estrutural, contendo pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxila em sua estrutura. São classificados em dois grupos principais, os flavonoides (flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonas, diidroflavonóis, flavan-3-ols, proantocianidinas e antocianidinas) e não flavonoides (ácidos fenólicos), sendo os flavonoides os mais bioativos. E diferentes práticas de pré e pós-colheita podem ser críticas para o

acúmulo ou degradação destes compostos em frutas e hortaliças (DE LA ROSA et al., 2019).

Os principais flavonóides da romã são catequina, epicatequina, caempferol, quercetina, luteolina, rutina e antocianinas (MELGAREJO-SÁNCHEZ et al., 2021). A variação na cor entre as diferentes cultivares de romã deve-se principalmente às diferentes concentrações de antocianina (KANDYLIS; KOKKINOMAGOULOS, 2020).

As antocianinas, importantes antioxidantes naturais com grande destaque na composição do fruto de romã, potencialmente benéficas à saúde, são também responsáveis pela coloração dos produtos obtidos a partir do suco de romã, sendo este um dos parâmetros de qualidade que mais influenciam na aceitação sensorial pelos consumidores (SANTIAGO, 2014). Os taninos, como a punicalagina, representam a classe predominante de compostos bioativos da romã, concentrando-se em maior parte na casca e no mesocarpo do fruto, com reconhecidas atividades antioxidante e anti-inflamatória (BORGUINI et al., 2014).

As diferentes partes da fruta da romã têm diversas capacidades bioativas, porém a casca possui a quantidade mais substancial de compostos bioativos (MELGAREJO-SÁNCHEZ et al., 2021).

De la Rosa et al. (2019) relataram que durante o manuseio pós-colheita, os ferimentos, a temperatura, a atmosfera modificada, a irradiação e os tratamentos eliciadores são conhecidos por serem utilizados para regular o conteúdo de compostos fenólicos em frutas e hortaliças, já que induzem o estresse oxidativo, formando espécies reativas de oxigênio (ROS), ativando o sistema de defesa da planta, que envolve a síntese de metabólitos secundários antioxidantes, como os compostos fenólicos e a ativação de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) e ascorbato peroxidase (APX).

Segundo Nunes (2015) o emprego da irradiação em frutas parece contribuir não apenas na melhoria da qualidade microbiológica, mas também como estímulo do metabolismo secundário das plantas, e consequentemente, proporcionando aumento no teor de compostos com função antioxidante.

A radiação tem sido usada como uma ferramenta para melhorar as propriedades biológicas e fisiológicas de compostos naturais por meio de modificações estruturais (KUMAR A et al., 2020). A radiação pode acarretar modificações em diferentes processos bioquímicos e fisiológicos, cuja extensão é

variável com a dose utilizada, com a idade dos tecidos e com o estresse fisiológico ao qual o tecido foi exposto (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

O aumento da demanda por alimentos naturais ou frescos fez com que novas formas de conservação fossem estudadas, visando minimizar suas perdas qualitativas, mantendo-os mais próximos do *in natura* e com uma vida de prateleira mais estável (MONTEIRO, 2006). A irradiação de alimentos é um processo que pode melhorar a segurança dos alimentos (ALIGHOURCHI et al., 2008).

A irradiação de frutos é um processo que consiste em submetê-los, já embalados ou a granel, a uma quantidade controlada de energia ionizante, por um tempo prefixado, com objetivos bem determinados e diferentemente dos tratamentos químicos, não deixa resíduos. Desta forma, os produtos irradiados podem ser transportados, armazenados ou consumidos imediatamente após o tratamento (VIEITES, 2009).

Fontes de radiação como as de ^{60}Co e ^{137}Cs são consideradas de uso comercial, devido à produção de raios gama de energias adequadas, disponibilidade e custo. O ^{60}Co é a fonte de maior aceitação por apresentar-se na forma metálica e ser insolúvel em água, proporcionando maior segurança ambiental (SILVA; ROZA, 2010). O radioisótopo ^{60}Co possui uma meia vida de aproximadamente cinco anos (VIEITES, 2009).

O manuseio adequado da romã, associado a tecnologias que reduzem a sua deterioração, possibilita sua comercialização *in natura* em mercados mais distantes, uma vez que reduz a perda dos atributos de qualidade visual, físico-químicos e nutricionais (MOREIRA et al., 2015).

Objetivou-se com o presente estudo avaliar a influência da utilização de raios gama na biossíntese e manutenção de compostos bioativos em pós-colheita de romã 'Comum'.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material Vegetal

A romã 'Comum' utilizada neste trabalho foi colhida no dia 5 de junho de 2019, em estágio de maturação comercial (parâmetro utilizado pelo produtor), quando a casca atingiu a cor característica de variedade, com superfície brilhante e

cerosa, em pomar de cultivo comercial no município de Alvares Machado (latitude 22° 04' 46" S, longitude 51° 28' 19" O e 475 m de altitude), região de Presidente Prudente, estado de São Paulo (Figura 1). No mesmo dia da colheita os frutos foram transportados em carro com ar condicionado para o laboratório de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP de Botucatu/SP, onde foram selecionados manualmente e visualmente, de forma aleatoria para uniformização do lote, padronizando o tamanho dos frutos, eliminando frutos com danos físicos (amassados e/ou rachados) e biológicos (doenças e/ou pragas).

3.2.2 Irradiação dos frutos

Foram embalados aleatoriamente dois frutos por bandeja de poliestireno expandido revestidos com filme de policloreto de vinila (espessura 0,020mm) e em seguida acondicionados em caixas de papelão revestidas internamente de poliestireno expandido e encaminhados em carro com ar condicionado para o IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP/Campus de São Paulo, onde foram submetidos a doses de irradiação com Cobalto 60 (^{60}Co) em irradiador multipropósito do tipo compacto onde utiliza raios gama.

Foram aplicadas as doses: 0,0 kGy (controle); 0,3 kGy; 0,6 kGy; 0,9 kGy; 1,2 kGy e 1,5 kGy. A taxa de dose utilizada foi de 2,59 kGy/h.

Após submetidos às doses de radiação os frutos foram transportados em carro com ar condicionado para o Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP de Botucatu e foram armazenados em câmara fria com temperatura de $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e $90 \pm 5\%$ de UR (PAREEK et al., 2015), analisados a cada 5 dias, durante 30 dias.

3.2.3 Preparo das amostras de polpa e casca de romã

A separação das sementes e da casca foi feita manualmente em ambiente sem luz, para evitar a degradação dos compostos bioativos. A polpa (sarcotesta) (MELGAREJO et al., 2020) foi extraída pela pressão realizada com auxílio de um rolo de massa sobre as sementes.

As amostras de polpa e casca de romã foram congeladas em nitrogênio líquido imediatamente após separação e mantidas em freezer com temperatura de -20° C até o momento das análises.

3.2.4 Variáveis analisadas

Foram avaliados para polpa e casca da romã 'Comum' os Compostos Fenólicos Totais (CFT) e Atividade Antioxidante (AA), pelos métodos DPPH e FRAP. Flavonoides totais (FT) e Antocianina monomérica foram avaliadas para a polpa. Para as avaliações de CFT, FT e AA por DPPH utilizou-se metodologia pré-definida no capítulo 1.

3.2.4.1 Preparo dos Extratos

Para análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT), os extratos foram obtidos utilizando-se 100 mg de casca de romã congelada e macerada em nitrogênio e 200 mg de polpa de romã congelada foram pesados em tubos falcon e extraídos com 10 mL de metanol 40% e acetona 20% acidificada com HCl a 0,1N, respectivamente. Após prontos, os extratos da casca da romã foram diluídos na proporção de 0,5 ml de extrato para 9,5 ml metanol 40%.

Para obtenção dos extratos para a análise de Flavonoides Totais (FT), 500 mg de polpa de romã congelada foram pesados em tubos falcon e extraídos com 10 mL de água.

Para Atividade Antioxidante (AA) por DPPH os extratos foram obtidos utilizando-se 10 mg de casca de romã congelada e macerada em nitrogênio e 20 mg de polpa de romã congelada foram pesados em tubos falcon e extraídos com 10 mL de metanol 20% e etanol 60%, respectivamente. Para AA pelo método FRAP utilizou-se os mesmos extratos obtidos para o método DPPH. Após prontos os extratos da casca da romã foram diluídos na proporção de 1 ml de extrato para 14 ml metanol 20%.

Os processos de extrações foram feitos em banho ultrassônico por 20 minutos e a mistura foi centrifugada a 6000 rpm durante 45 minutos para FT e durante 15 minutos para CF e AA (métodos DPPH e FRAP) e posteriormente retirou-se o sobrenadante para composição do extrato final. Os pesos utilizados para as

amostras foram previamente definidos. O processo de extração foi realizado em triplicata.

3.2.4.2 Determinação de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A quantidade de CFT nos extratos de polpa e casca de frutos foi determinada de acordo com o método Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999) com algumas modificações. Uma alíquota de 0,5 ml dos extratos ou solução padrão de ácido gálico (5 a 100 ug/ml) e 2,5 ml de reagente de Folin-Ciocalteu (diluído em água 1:10) foram adicionadas em tubo de ensaio. Após 5 minutos foram adicionados 2 ml de carbonato de sódio (4%, p/v). Os tubos foram agitados e incubados em sala escura à temperatura ambiente por 2 horas. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (BEL SP 1105) a 765 nm (comprimento de onda pré-definido em varredura). As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama de amostra fresca (mg GAE/g).

3.2.4.3 Determinação de flavonoides totais (FT)

A quantidade de FT nos extratos da polpa dos frutos foi determinada de acordo com o método de Zhishen et al. (1999). Adicionou-se uma alíquota de 1 ml dos extratos ou solução padrão de rutina (20 a 200 ug/ml) em tubos de ensaio, 4 ml de água deionizada e 0,30 ml de NaNO_2 (5%). Após cinco minutos foi adicionado 0,3 ml de AlCl_3 (10%). Percorrido mais cinco minutos foi adicionado 2 ml de NaOH a 1 mol L^{-1} . Todos os procedimentos ocorreram em temperatura ambiente. As leituras foram realizadas contra o branco em comprimento de onda 510 nm. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como mg equivalente de rutina por grama de amostra fresca (mg RE/g).

3.2.4.4 Atividade Antioxidante pelo método DPPH (AA)

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) é baseado na captura do radical DPPH estável (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes e foi utilizado para determinar a AA nos extratos de polpa e casca dos frutos. Em tubos de ensaio

adicionou-se 3,0 ml do solvente de extração PA, uma alíquota de 0,5 ml dos extratos ou solução padrão de Trolox e 0,3 ml do radical DPPH. As misturas foram deixadas durante 45 minutos em temperatura ambiente, em sala escura e a absorbância medida em espectrofotômetro (BEL SP 1105) a 517 nm contra um branco. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em mg de equivalente Trolox por grama de amostra fresca (mg Trolox/g).

3.2.5.5 Poder redutor férrico (FRAP)

O poder redutor férrico dos extratos de romã foi determinado pelo método de Benzie and Strain (1996). 40 µl de extrato de polpa ou de casca de frutos foram misturado com 270 µl de água destilada e 2,7 ml de reagente FRAP. Após incubação a 37°C por 30 min, a absorbância da mistura foi medida em espectrofotômetro (BEL SP 1105) a 595 nm. O reagente FRAP foi preparado pela mistura de 2,5 ml de uma solução de 2,4,6-tris (1-piridil) -5-triazina (TPTZ) 10 mM em HCl 40 mM com 2,5 mL de FeCl₃ 20 mM, 6H₂O e 25 mL de tampão de acetato 0,3 M pH 3,6. Uma curva de calibração foi preparada, utilizando uma solução aquosa de sulfato ferroso FeSO₄, 7H₂O (10 a 2000 µM). As análises foram realizadas em triplicata. Os valores de FRAP foram expressos em mg de Fe²⁺ por g de amostra fresca.

3.2.5.6 Antocianina monomérica total da polpa

O conteúdo de antocianina foi medido pelo método diferencial de pH (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). Uma alíquota de 0,4 mL de cada amostra de polpa de romã foi levada a pH 1,0 pela adição de 3,6 mL de solução tampão cloreto de potássio pH 1,0 (25 mM) e a pH 4,5 por 3,6 mL de solução tampão acetato de sódio pH 4,5 (0,4 M), respectivamente. A absorbância das soluções da mistura de reação foi lida contra água como branco, em 510 nm e a 700 nm, após 15 minutos em repouso, usando um espectrofotômetro (BEL SP 1105) à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como mg Cy (equivalente de cianidina-3-glicosídeo) / L polpa.

3.2.6 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 6 x 7, sendo seis doses de irradiação (0,0 kGy (controle); 0,3 kGy; 0,6 kGy; 0,9 kGy; 1,2 kGy e 1,5 kGy) e sete dias de avaliação (zero, 5, 10, 15, 20, 25 e 30), com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Tukey, $p \leq 0,05$; e também a $p \leq 0,01$.

Os resultados foram apresentados em médias com desvio padrão (média $\pm$ DP). As análises foram realizadas pelo software estatístico Sisvar versão 5.6 (Lavras, MG, Brasil) e os gráficos com média e desvio padrão foram gerados pelo GraphPad Prism versão 8.0.1 (San Diego, CA, EUA).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da ANOVA para as doses de irradiação gama com cobalto 60 (0,0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e 1,5 kGy), dias de armazenamento (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias) e suas interações para os compostos bioativos da romã 'Comum', foram apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Análise de variância (ANOVA) das variáveis com significância das doses de irradiação, dias e a interação destes fatores.

	Doses (kGy)	Dias	Doses x Dias
Compostos fenólicos totais da casca (mg GAE/g)	**	**	**
Compostos fenólicos totais da polpa (mg GAE/g)	**	**	**
Flavonoides totais da polpa (mg RE/g)	**	**	**
Atividade Antioxidante por DPPH da casca (mg Trolox/g)	**	**	**
Atividade antioxidante por DPPH da polpa (mg Trolox/g)	**	**	**
Atividade Antioxidante FRAP da casca (mg de Fe^{2+} /g)	**	**	**
Atividade antioxidante FRAP da polpa (mg de Fe^{2+} /g)	**	**	**
Antocianina Monomérica da polpa (mg Cy/L)	**	**	**

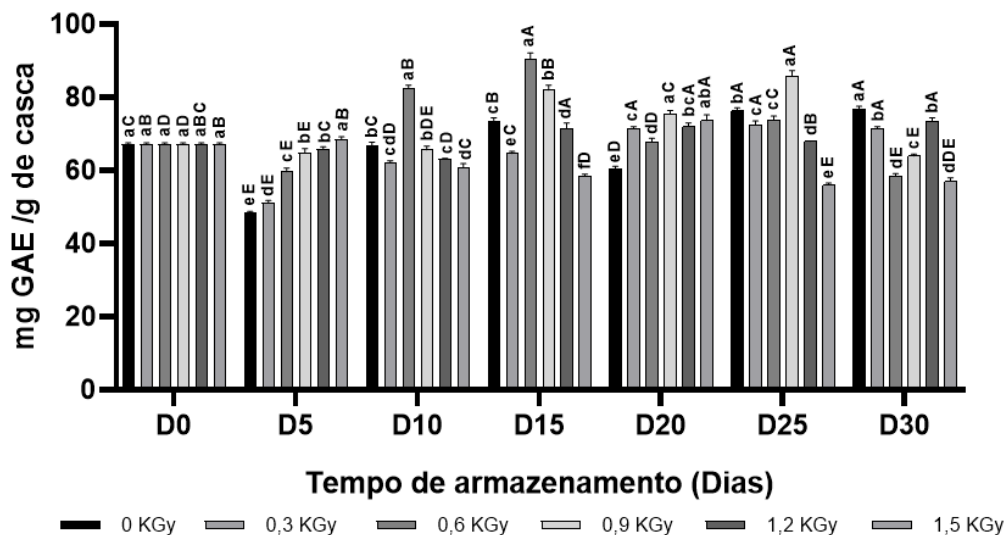
ns não significativo; * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$

3.3.1 Compostos fenólicos totais

Para a variável compostos fenólicos totais para a casca da romã 'Comum', ocorreu diferença significativa para as doses, dias de armazenamento e houve interação entre os fatores (Figura 1).

Entre as doses de radiação gama utilizadas, verificou-se no dia 5 o maior conteúdo de compostos fenólicos totais para a dose 1,5 KGy (68,44 mg GAE/g) para a casca da romã. Bem como pode-se observar a tendência de maior conteúdo fenólico quanto maior a dose de radiação, comparativamente aos frutos não irradiados.

Figura 1 - Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/g) da casca da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



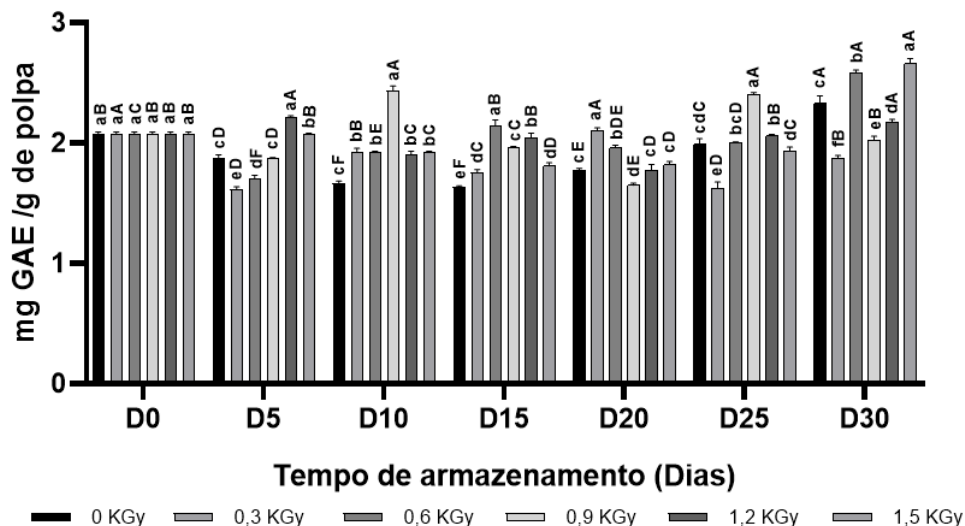
Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

A dose 0,6 KGy apresentou tendência de aumento de compostos fenólicos entre os dias 5 e 15. Porém ao final do período de armazenamento, os frutos não irradiados (76,82 mg GAE/g) e os frutos irradiados com as doses 0,3 KGy (71,52 mg GAE/g) e 1,2 KGy (73,54 mg GAE/g) apresentaram os maiores valores para estes compostos.

Resultados diferentes foram obtidos por Lacerda (2020) para a casca da pitaya branca comum (*Hylocereus undatus* Haw.) com a diminuição dos compostos fenólicos até o dia 15 e de acordo com Prakash e Ornelaz-Paz (2019) a irradiação pode aumentar ou reduzir os níveis de compostos fenólicos em vegetais frescos.

Para a variável compostos fenólicos totais para a polpa da romã 'Comum', ocorreu diferença significativa para as doses, dias de armazenamento e houve interação entre os fatores (Figura 2).

Figura 2 - Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/g) da polpa da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $90 \pm 5\%$ por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Entre as doses estudadas foi possível observar que nos dias 10 e 25 a dose 0,9 KGy apresentou o maior teor de compostos fenólicos para a polpa, com 2,43 e 2,41 mg GAE/g, respectivamente e manteve o teor destes compostos ao final do período de armazenamento.

O teor de compostos fenólicos reduziu para a polpa dos frutos não irradiados, entre os dias zero (2,08 mg GAE/g) e 15 (1,63 mg GAE/g), e aumentou após esta data até o dia 30 (2,33 mg GAE/g). Porém ao final do período de armazenamento os maiores teores foram observados para as doses 1,5 KGy (2,66 mg GAE/g), 0,6 KGy (2,59 mg GAE/g), 0 KGy (2,33 mg GAE/g) e 1,2 KGy (2,17 mg GAE/g) em relação ao início do armazenamento.

Resultados diferentes foram relatados por Pourebrahimi et al. (2020), que observaram a redução de compostos fenólicos para a polpa da romã, sendo a maior redução para a dose 3 kGy e a menor redução para as amostras controle.

Segundo Hussain et al. (2010) a fenilalanina amônia-liase (PAL) é a enzima chave para metabolismo de fenóis. Desta forma para a romã 'Comum' pode ter havido aumento da atividade destas enzimas, em resposta ao estresse causado pela irradiação. Segundo Jeang e Jeang (2018) a aplicação de radiação ionizante resulta

em um aumento significativo nas espécies reativas de oxigênio (ROS), aumentando assim a expressão de genes relacionados à defesa, levando a um aumento na fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO), compostos fenólicos, quitinase e β -1,3-glucanase dentro das células.

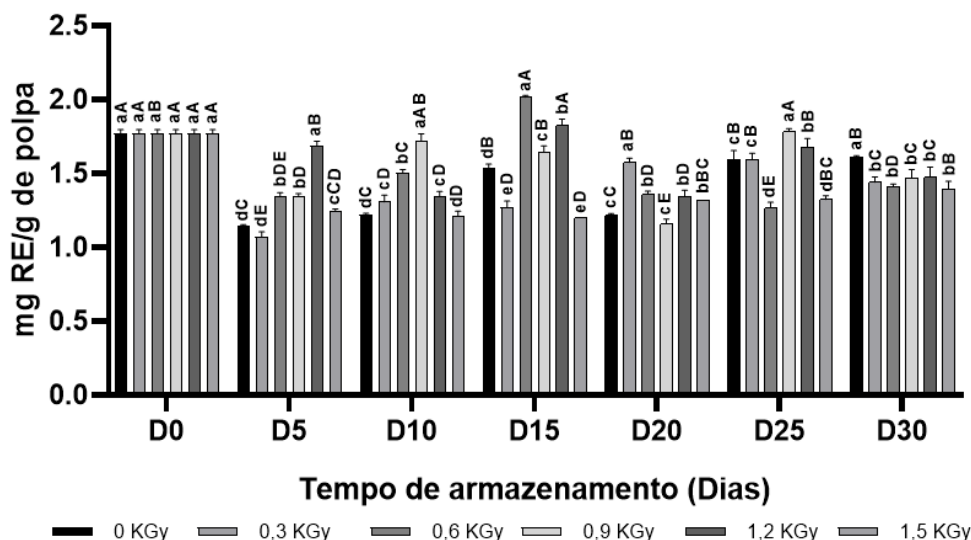
Porém a irradiação gama também pode aumentar o conteúdo de fenólicos totais devido à liberação de compostos fenólicos dos componentes glicosídicos e degradação de compostos fenólicos maiores em menores, com consequente melhora no rendimento de extração destes compostos (HUSSAIN et al., 2010).

Russo et al. (2018) avaliando compostos fenólicos em diferentes partes de frutos de romã, observaram alta concentração de compostos fenólicos na casca, com relação as amostras de polpa e suco para cada variedade estudada, o que também foi observado neste trabalho.

3.3.2 Flavonoides totais

Flavonoides são compostos bioativos pertencentes aos compostos fenólicos (DE LA ROSA et al., 2019). Para o conteúdo de flavonoides totais (Figura 3) da polpa da romã 'Comum', ocorreu diferença significativa para as doses, dias de armazenamento e houve interação entre os fatores.

Figura 3 - Flavonoides Totais (mg RE/g) da polpa da romã ‘Comum’ irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Entre as doses avaliadas, foi possível observar para o dia 30 que os frutos não irradiados apresentaram o maior teor para flavonoides (1,61 mg GAE/g). Porém ao final do período de armazenamento o teor de flavonoides totais reduziu para todas as doses avaliadas, o que pode ser indicativo de degradação destes compostos com o tempo de armazenamento.

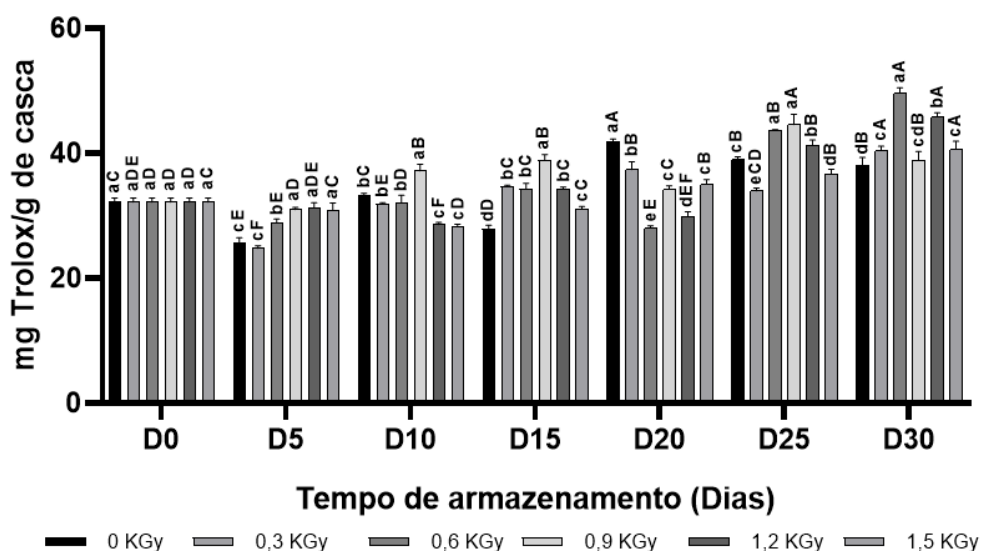
De acordo com Prakash e Ornelaz-Paz (2019) os aumentos nos níveis de compostos fenólicos são tipicamente observados em baixas doses de irradiação (<1 até 1,5 kGy) e são claramente observados para fenóis específicos, para morangos, frutas cítricas, mamões, abacates e mangas, diferindo do que foi observado para a romã ‘Comum’ neste trabalho ao final do armazenamento.

3.3.3 Atividade antioxidante por DPPH e FRAP

A atividade antioxidante por DPPH e FRAP (figuras 4 e 5) para a casca da romã ‘Comum’, apresentaram diferenças significativas para as doses, dias de armazenamento e houve interação entre os fatores.

Entre as doses de radiação gama utilizadas, verificou-se a tendência de aumento da atividade antioxidante pelo método DPPH (Figura 4) de acordo com o aumento da dose de radiação utilizada, para o dia 5, sendo a mesma tendência observada para o conteúdo de compostos fenólicos para a casca, para este mesmo dia. Ao final do armazenamento as doses 0,3 KGy, 0,6 KGy, 1,2 KGy e 1,5 KGy apresentaram aumento significativo para a atividade antioxidante da casca.

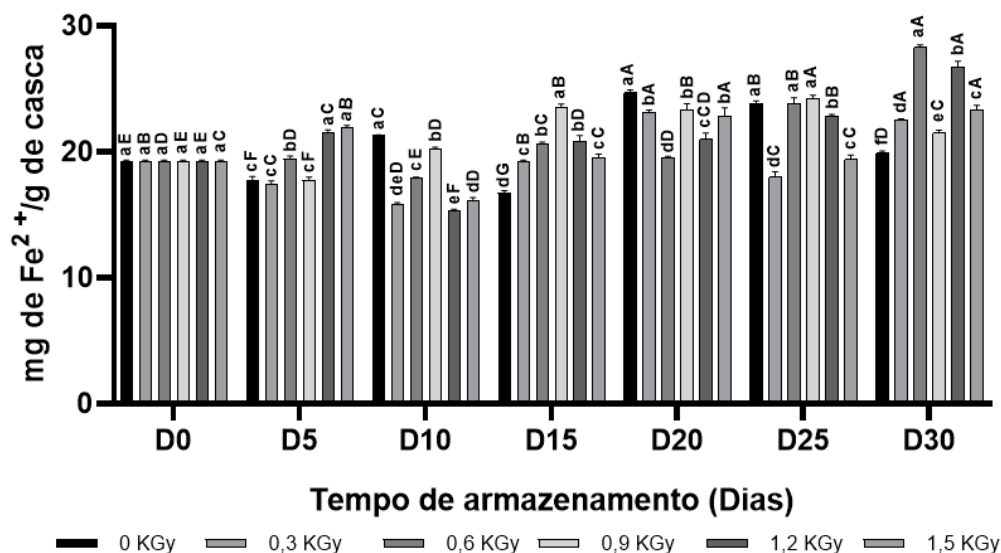
Figura 4 - Atividade Antioxidante pelo método DPPH (mg Trolox/g) da casca da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Ao final do armazenamento as doses 0,3 KGy, 0,6 KGy, 1,2 KGy e 1,5 KGy também aumentaram a atividade antioxidante da casca pelo método FRAP (Figura 5).

Figura 5 - Atividade Antioxidante pelo método FRAP (mg Fe²⁺/g) da casca da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias

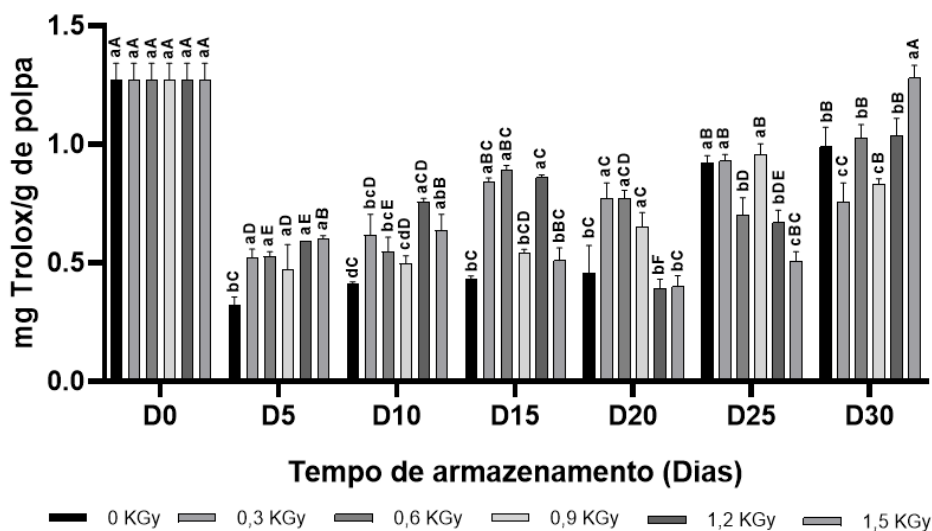


Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Para a atividade antioxidante por DPPH e FRAP para a polpa da romã 'Comum', ocorreram diferenças significativas para as doses, dias de armazenamento e houve interação entre os fatores.

A polpa dos frutos não irradiados apresentaram menor atividade antioxidante pelo método DPPH (Figura 6), entre os dias 5 e 20. A dose 1,5 KGy aumentou a atividade antioxidante da polpa ao final do armazenamento.

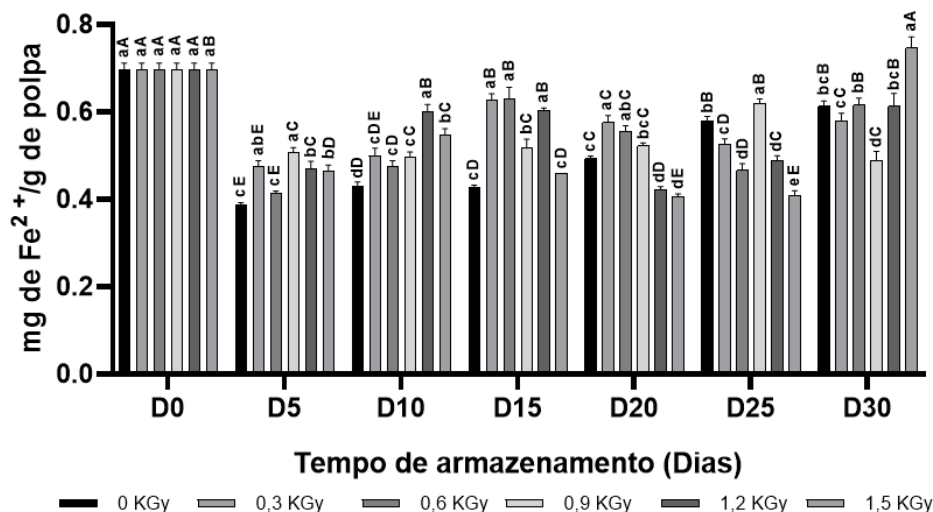
Figura 6 - Atividade Antioxidante pelo método DPPH (mg Trolox/g) da polpa da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $90 \pm 5\%$ por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

A atividade antioxidante por FRAP (Figura 7) aumentou entre os dias 5 e 30 para a polpa dos frutos não irradiados, diferindo da tendência observada pelo método DPPH. Porém ao final do armazenamento a dose 1,5 KGy também apresentou a maior atividade antioxidante.

Figura 7 - Atividade Antioxidante pelo método FRAP da polpa da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $90 \pm 5\%$ por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

A romã apresenta alta concentração de compostos fenólicos com atividade antioxidante (BORGUINI et al., 2014), desta forma a atividade antioxidante para a romã 'Comum' também está relacionada com sua composição fenólica.

Prakash e Ornelaz-Paz (2019) relataram que o aumento do conteúdo fenólico por irradiação tem sido atribuído ao estímulo da expressão gênica envolvida na codificação de enzimas da via biossintética do fenol, fato este que pode ter contribuído para o aumento da atividade antioxidante observada para a romã cv. Comum neste trabalho.

A bioatividade potencial da romã também é altamente dependente da variedade e da parte da fruta devido a variabilidade de compostos encontrados em cada variedade e parte da planta (MELGAREJO-SÁNCHEZ et al., 2021), o que também foi observado para a casca e para a polpa da romã 'Comum'.

3.3.4 Antocianina monomérica total

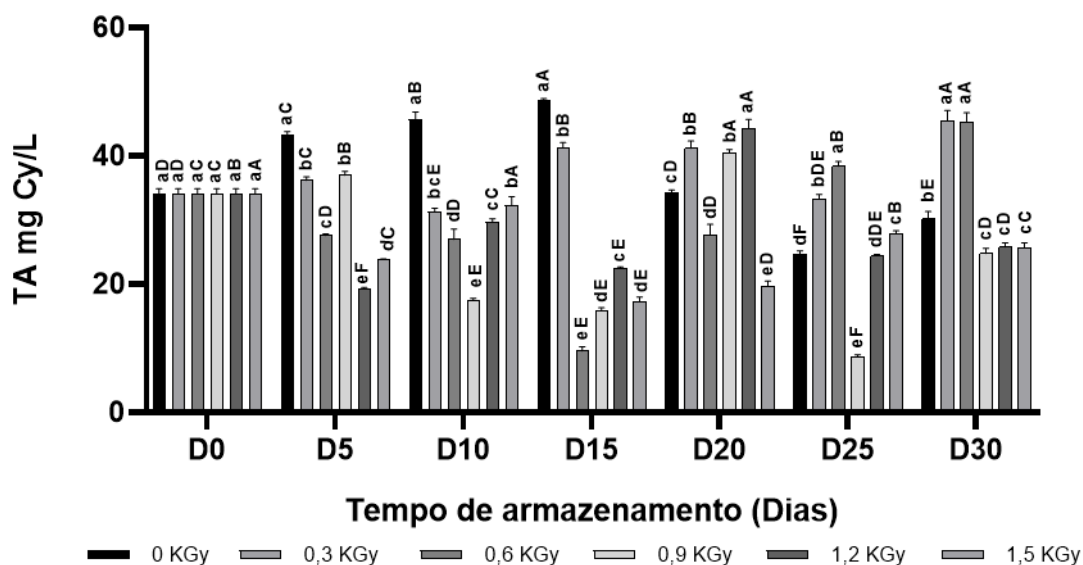
Os tipos e conteúdo de antocianina variam entre as cultivares de romã, sendo as principais antocianinas relatadas, delfinidina 3-glicosídeo, delfinidina 3,5-

diglucosídeo, pelargonidina 3-glicosídeo, pelargonidina 3,5-diglucosídeo, cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3,5-diglucosídeo (KAHRAMANOĞLU; USANMAZ, 2016).

Para o conteúdo de antocianina monomérica total para a polpa da romã 'Comum', ocorreram diferenças significativas para as doses, dias de armazenamento e houve interação entre os fatores (Figura 8).

Entre as doses de radiação gama utilizadas, foi possível observar que o conteúdo de antocianina monomérica para a polpa de frutos não irradiados, foi o maior nos dias 5, 10 e 15. E ao longo do armazenamento o conteúdo de antocianina monomérica aumentou do dia zero (31,12 mg Cy/L) ao dia 15 (48,65 mg Cy/L) para a polpa de frutos não irradiados.

Figura 8 - Antocianina monomérica total (mg Cy/L) da polpa da romã 'Comum' irradiada com radiação gama e armazenada a 10 ± 1 °C e umidade relativa 90 ± 5 % por 30 dias



Letras minúsculas diferem todas as doses em um único tempo de armazenamento e letras maiúsculas diferem todos os tempos de armazenamento em uma única dose, pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

O conteúdo de antocianina monomérica aumentou a partir do dia 15 até o final do período de armazenamento para a dose 0,6 KGy. Ao final do armazenamento o conteúdo de antocianina monomérica foi maior para a polpa dos frutos irradiados com 0,3 KGy (45,47 mg Cy/L) e 0,6 KGy (45,25 mg Cy/L), e degradou para as doses 0,9 KGy (24,77 mg Cy/L), 1,2 KGy (25,77 mg Cy/L) e 1,5 KGy (25,71 mg Cy/L).

Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Shahbaz et al. (2014) que observaram diminuição do conteúdo total de antocianinas com o aumento da dose de 0,4 kGy para 2 kGy. Alighourchi et al. (2008) observaram que os sucos de romã irradiados a 0,5 e 10 kGy mantiveram aproximadamente 80% e 10% do conteúdo inicial de antocianinas. Pourebrahimi et al. (2020) também relataram a redução do conteúdo de antocianina com aumento da dose de radiação de 0,5 para 3 kGy e durante o armazenamento de 30 dias.

Porém Quintão et al. (2020) não observaram diferença significativa nos valores de antocianina para morangos irradiados com diferentes doses de irradiação gama (0,8; 1,6 e 2,4 kGy) e a amostra controle.

Segundo Shahbz et al. (2014) a diminuição no conteúdo de antocianinas é principalmente devido à degradação de antocianinas individuais pela radiação.

3.4 CONCLUSÕES

Nas condições em que o presente trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

- A irradiação foi eficiente na síntese de compostos bioativos.
- A doses de radiação gama 0,3 KGy e 0,6 KGy aumentaram o conteúdo de antocianina monomérica total da polpa da romã 'Comum' ao longo do armazenamento.
- A radiação gama na dose 0,6 KGy aumentou a atividade antioxidante da casca.
- A dose de 1,5 KGy promoveu aumento no conteúdo de compostos fenólicos totais e manteve a atividade antioxidante da polpa da romã ao final do armazenamento.

REFERÊNCIAS

- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Anal. Biochem.** v. 239, p. 70–76, 1996.
- BORGUINI, R.G. et al. **Avaliação do teor de punicalagina em cascas de romã cultivar wonderful**. 2014. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/997555>>. Acessado em: 24 de maio 2018.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.
- DE LA ROSA, L. A. et al. Phenolic Compounds. In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**. Woodhead Publishing, 2019, p. 253-271.
- GARCÍA, P. et al. Recovery of Bioactive Compounds from Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Using Pressurized Liquid Extraction. **Foods**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2021.
- GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, R.E. Wrolstad (Ed.). 2001. p 1–13.
- HUSSAIN, P.R. et al. Gamma irradiation induced enhancement of phenylalanine ammonialyase (PAL) and antioxidant activity in peach (*Prunus persica* Bausch, Cv. Elberta). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 79, p. 982-989, 2010.
- JEONG, M. A.; JEONG, R. D. Applications of ionizing radiation for the control of postharvest diseases in fresh produce: recent advances. **Plant Pathology**, v. 67, p.18–29, 2018.
- KAHRAMANOGLU, I; USANMAZ, S. **Pomegranate production and marketing**. 1. ed. CRC Press, Boca Raton, 2016. 148p.
- KALAYCIOGLU, Z.; ERIM, F. B. Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. **Food Chemistry**, v. 221, p. 496–507, 2017.
- KANDYLIS, P.; KOKKINOMAGOULOS, E. Food Applications and Potential Health Benefits of Pomegranate and its Derivatives. **Foods**, v. 9, p. 1-21, 2020.
- KUMAR A, A. A. et al. Gamma radiation induced changes in antioxidant and radioprotective activities of flavonoids differing mainly with respect to –OH substitution pattern in B and C rings. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 326, p. 801–811, 2020.

LACERDA, V. R. **Irradiação gama na pós-colheita dos frutos de pitaya vermelha de polpa branca**. 2020. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura). – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

LAVORO, A. et al. Pomegranate: A promising avenue against the most common chronic diseases and their associated risk factors (Review). **International Journal of Functional Nutrition**, v. 2, p. 1-12, 2021.

MELGAREJO, P. et al. Pomegranate (*Punica granatum* L.) a dry pericarp fruit with fleshy seeds. **Trends in Food Science & Technology**, v. 102, p 232–236, 2020.

MELGAREJO-SANCHEZ, P. et a. Pomegranate variety and pomegranate plant part, relevance from bioactive point of view: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 2, p 1-29, 2021.

MOREIRA, I. S. et al. Biometria e componentes físico-químicos de romã armazenada sob refrigeração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 2, p. 209-215, 2015.

NUNES, S. P. **Irradiação gama e UV – C na qualidade pós-colheita de mirtilo**. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

PAREEK, S. et al. Postharvest biology and technology of pomegranate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 95, p. 2360–2379, 2015.

PATHAK, P. D. et al. Valorization of Pomegranate Peels: A Biorefinery Approach. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, p. 1127–1137, 2017.

POTT, D. M. et al. An Overview of Some Secondary Compounds Derived From the Primary Metabolism for Their Role in Conferring Nutritional and Organoleptic Characteristics to Fruit. **Frontiers in Plant Science**. v. 10 , p.1–19, 2019.

POUREBRAHIMI, Y. et al. Effect of Gamma Irradiation on the Quality Characteristics and Shelf Life of Pomegranate Arils during Refrigerated Storage. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 22, p. 723-735, 2020.

PRAKASH, A; ORNELAS-PAZ, J. J. Irradiation of Fruits and Vegetables. In: **Postharvest Technology of Perishable Horticultural Commodities**. Woodhead Publishing, 2019. p. 563-589.

QUINTÃO, A. L. C. et al. Influência do tratamento com radiação gama no perfil de compostos fenólicos e nos parâmetros de qualidade de morangos cv. Albion durante o armazenamento. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, e991975147, 2020.

RUSSO, M. et al. Analysis of phenolic compounds in different parts of pomegranate (*Punica granatum*) fruit by HPLC-PDA-ESI/MS and evaluation of their antioxidant

activity: application to different Italian varieties. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 410, p. 3507–3520. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-018-0854-8>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

SANTIAGO, M. C. P. A. **Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum* L.)**. 2014. Tese (doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2014.

SILVA, A. L. F.; ROZA, C. R. USO DA IRRADIAÇÃO EM ALIMENTOS: REVISÃO. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 28, n. 1, p. 49-56, 2010.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, n., p. 152-178, 1999.

VIEITES, R. L. Conservação pós-colheita de frutos com a utilização da irradiação. In: NEVES, L. C. (org.). **Manual pós-colheita da fruticultura brasileira**. Londrina: EDUEL, 2009. p. 189-212.

YAHIA, E. M. Introduction. In: ____ (Ed.). **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**. Woodhead Publishing, 2019, p. 1-17.

ZAOUAY, F.; MENA, P.; GARCIA-VIGUERA, C.; MARS, M. Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. **Industrial Crops and Products**. v. 40, p. 81-89, 2012.

ZHISHEN, J. et al. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v.64, p.555-559, 1999.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A escolha das condições adequadas para extração de compostos bioativos é fundamental para o desempenho da extração e quantificação desses compostos.

O uso de radiação gama na dose correta e armazenamento refrigerado, em pós-colheita da romã 'Comum', podem minimizar as perdas qualitativas durante o armazenamento, prolongando a vida de prateleira, o período de comercialização e sua disponibilidade para a indústria de processamento.

A utilização da radiação gama para incrementar o conteúdo de compostos bioativos pode modificar os efeitos benéficos para a saúde, bem como a aceitação da fruta pelos consumidores.

Pesquisas contínuas sobre os componentes bioativos específicos da romã 'Comum', são promissoras para incentivar o processamento de produtos que podem trazer benefícios à saúde.

REFERÊNCIAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. 2001.
- BEZERRA, E. S. et al. Plantas medicinais para uso humano. In: BARACUHY, J. G. V. et al. (Org.). **Plantas Medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil**. 2. ed. Campina Grande: EDUEFG, 2016. p. 21-71.
- BORGUINI, R.G. et al. **Avaliação do teor de punicalagina em cascas de romã cultivar wonderful**. 2014. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/997555>>. Acessado em: 24 de maio 2018.
- CARUSO, A. et al. Pomegranate: Nutraceutical with Promising Benefits on Human Health. **Applied Sciences**, v. 10, n. 6915, p. 1-34, 2020.
- CHANDRA, D.K. et al. Origin, history and domestication of pomegranate R. Chandra (Ed.), Pomegranate. Fruit Veg. Cereal Sci. Biotechnol. v. 4, p. 1-6. 2010.
- CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. (Eds.), Biochemistry & Molecular Biology of Plants. p. 1250-1318. 2000.
- CORONADO-REYES, J. A. et al. Morphology about the varieties mexican pomegranate fruit (*Punica granatum*) and its ripening stage. **Food Science and Technology**, p. 1-7, 2020.
- DAMIÃO FILHO, C. F. Morfologia vegetal. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1993. 243p.
- DE LA ROSA, L. A. et al. Phenolic Compounds. In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**. Woodhead Publishing, 2019, p. 253-271.
- DIONÍSIO, A. P.; GOMES, R. T.; OETTERER, M. Ionizing Radiation Effects on Food Vitamins - A Review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1267-1278, 2009.
- FERNANDES, L. et al. Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. **European Food Research and Technology**, v. 243, p. 1799–1814, 2017.
- FERREIRA, A. F. A. **Propagação vegetativa de Romãzeira (*Punica granatum* L.)**. 2017. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2017.
- GRAHAM, S.A. et al. Phylogenetic analysis of the Lythraceae based on four gene regions and morphology. **International Journal of Plant Sciences**. 166, 995-1017. 2005.

JAIN, A. et al. Research Paper Effect of phytosanitary irradiation on the quality of two varieties of pummelos (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.). **Scientia Horticulturae**, v. 217, p. 36-47, 2017.

JAMWAL, K.; BHATTACHARYA, S.; PURI, S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 9, p. 26–38, 2018.

JEONG, M. A.; JEONG, R. D. Applications of ionizing radiation for the control of postharvest diseases in fresh produce: recent advances. **Plant Pathology**, v. 67, p. 18–29, 2018.

KAHRAMANOGLU, I; USANMAZ, S. **Pomegranate production and marketing**. 1. ed. CRC Press, Boca Raton, 2016. 148p.

KANDYLIS, P.; KOKKINOMAGOULOS, E. Food Applications and Potential Health Benefits of Pomegranate and its Derivatives. **Foods**, v. 9, p. 1-21, 2020.

KAR, C. E. et al. Pomegranate (*Punica granatum*) Juices: Chemical Composition, Micronutrient Cations, and Antioxidant Capacity. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. 795-800, 2011.

KUMAR, R. et al. Production Technology of Pomegranate in Arid Region. Central Institute for arid horticulture. Technical Bulletin Nº 65, 2018, 25p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MASTRO, N. L. A radiação ionizante na promoção da alimentação adequada e saudável. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 114-121, 2015.

MELGAREJO, P. et al. Pomegranate (*Punica granatum* L.) a dry pericarp fruit with fleshy seeds. **Trends in Food Science & Technology**, v. 102, p 232–236, 2020.

MELGAREJO-SANCHEZ, P. et a. Pomegranate variety and pomegranate plant part, relevance from bioactive point of view: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 2, p 1-29, 2021.

MOREIRA, I. S. et al. Biometria e componentes físico-químicos de romã armazenada sob refrigeração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 2, p. 209-215, 2015.

MORENO, P. M. Conferencia general: el granado, su problemática y usos. 2010. In: I Jornadas Nacionales sobre el granado. Disponível em: <<http://dpvm.umh.es/docs/publicaciones/i%20jornadas%20nacionales%20sobre%20el%20granado.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

MORZELLE, M.C. et al. Potential benefits of phenolics from pomegranate pulp and peel in Alzheimer's disease: antioxidant activity and inhibition of acetylcholinesterase. **Journal of Food Bioactives**. v. 5, p. 136–141, 2019. <https://doi.org/10.31665/JFB.2019.5181>.

NUNES, S. P. **Irradiação gama e UV – C na qualidade pós-colheita de mirtilo**. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

PAREEK, S. et al. Postharvest biology and technology of pomegranate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 95, p. 2360–2379, 2015.

POTT, D. M. et al. An Overview of Some Secondary Compounds Derived From the Primary Metabolism for Their Role in Conferring Nutritional and Organoleptic Characteristics to Fruit. **Frontiers in Plant Science**. v. 10, p.1–19, 2019.

RUSSO, M. et al. Analysis of phenolic compounds in different parts of pomegranate (*Punica granatum*) fruit by HPLC-PDA-ESI/MS and evaluation of their antioxidant activity: application to different Italian varieties. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 410, p. 3507–3520. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-018-0854-8>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

SANTIAGO, M. C. P. A. **Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum* L.)**. 2014. Tese (doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2014.

SHARMA, P.; MCCLEES, S. F.; AFAQ, F. Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. **Molecules**. v. 22, n. 1, 177, 2017.

SHULMAN, Y. et al. Pomegranate fruit development and maturation. **Journal of Horticultural Science**, v. 59, p. 265-274, 1984.

SILVA, A. L. F.; ROZA, C. R. USO DA IRRADIAÇÃO EM ALIMENTOS: REVISÃO. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 28, n. 1, p. 49-56, 2010.

SUZUKI, E. T. **Avaliação fenológica, análise econômica e estudo da cadeia produtiva da romã (*Punica granatum*)**. 2016. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artemed, 2013. 918p.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. et al. Pomegranate biology and biotechnology: A review. **Scientia horticultrae**. v. 160, p. 85-107, 2013.

VIEITES, R. L. Conservação pós-colheita de frutos com a utilização da irradiação. In: NEVES, L. C. (org.). **Manual pós-colheita da fruticultura brasileira**. Londrina: EDUEL, 2009. p. 189-212.

YAHIA, E. M. Introduction. In:____(Ed.). **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**. Woodhead Publishing, 2019, p. 1-17.