

MIRIANE LUCAS AZEVEDO

Química de Alimentos

M.Sc. em Ciências

**Perfil fitoquímico, atividades antioxidante e antimicrobiana
de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy em diferentes
estádios de maturação cultivada em clima temperado**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Orientador: Jorge Adolfo Silva

PELOTAS, 2011

**Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)**

A994p Azevedo, Miriane Lucas

Perfil fitoquímico, atividades antioxidante e antimicrobiana de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy em diferentes estádios de maturação cultivada em clima temperado / Miriane Lucas Azevedo ; orientador Jorge Adolfo Silva. - Pelotas, 2011.-75f. ; il..- Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1. Amora-preta 2. Estádios de maturação 3. Compostos Fenólicos 4. Antocianinas 5. Ácido L-ascórbico 6. Carotenóides 7. Tocoferóis 8. Atividade antioxidante 9. Atividade antimicrobiana I Silva, Jorge Adolfo(orientador) II .Título.

CDD 664.8

Banca examinadora:

Prof. Dr. Jorge Adolfo Silva

Prof^a. Dr^a. Rosane Rodrigues

Prof^a. Dr^a. Josiane Freitas Chim

Prof^a. Dr^a. Renata Gimenez Sampaio Zocche

Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra

*Dedico às pessoas mais importantes da minha vida:
meus pais, Paulo e Gicelda
e a meu namorado Leonardo.*

Agradecimentos

A Deus, pela vida, força e coragem.

Aos meus pais, Paulo e Gicelda, por ser quem eu sou hoje e tudo mais.

Ao meu namorado, Leonardo, pelo amor e paciência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Adolfo Silva pela brilhante orientação, paciência e amizade.

Aos colegas e professores do PPGCTA, DCA, Fisiologia Vegetal e Cembiot. Em especial, por também serem amigos, Angelita Leitão, Andréa Teixeira, Sarah Cogo Prestes, Aline Medina, Roberta Mânica, Suziane Antes, Ciane Gonçalves, Renata Sampaio Zocche, Cleonice Rosa, Andressa Jacques, Letícia Mascarenhas, Ana Paula Antunes, Rui Zambiazzi, Rosane Rodrigues, Mírian Galvão, Eliezer Gandra, Fernanda Nedel, Fabiana Seixas, Michel Fagundes, Luciana Nogueira, Valmor Bianchi, Lírio Inácio Haas e Fernando Zocche.

Aos amigos, por serem um pedaço de mim que eu mesma não consegui ser, Alessandra Santos, Laura Lucas, Tia Maria Inácia, Tia Sofi e, mais ainda, por ser sempre a minha maior incentivadora, companheira e fonte de inspiração Josiane Chim.

Aos estudantes de iniciação científica Jardel Casaril, Railson dos Santos, Cristiane Stocker, Letícia Winke, Gustavo Zimmer.

Ao secretário do PPGCTA, Marcos Oliveira, pela atenção e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da UFPel.

À Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

*“A imaginação é mais importante que a ciência,
porque a ciência é limitada, ao passo que a
imaginação abrange o mundo.”*

Albert Einstein

(1879 – 1955)

Resumo

AZEVEDO, Miriane Lucas. **Perfil fitoquímico, atividades antioxidante e antimicrobiana de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy em diferentes estádios de maturação cultivada em clima temperado**. 2011. 75f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Amora-preta (*Rubus fruticosus*) é considerada um fruto rico em compostos fitoquímicos, principalmente ácidos fenólicos e antocianinas, que possuem um elevado potencial antioxidante e também estão presentes ácido L-ascórbico, carotenóides e tocoferóis. Com base nas mudanças de concentração que esses compostos sofrem ao longo dos estádios de amadurecimento do fruto, este trabalho tem por objetivo estudar as alterações no perfil fitoquímico da amora-preta cv. Tupy, cultivada em clima temperado, na região de Pelotas, e os efeitos na capacidade antioxidante e antimicrobiana. Foram determinados cinco pontos de maturação do verde ao mais maduro, através da coloração externa do fruto, e para confirmar as diferenças entre estes, cada estágio foi avaliado físico-quimicamente, determinando-se acidez total titulável (AT), sólidos solúveis totais (SS), índice de maturação (SS/AT) e análise instrumental da cor (ângulo hue). Com relação ao perfil fitoquímico foram analisados os compostos fenólicos, ácido L-ascórbico, carotenóides e tocoferóis. Pode-se afirmar que de acordo com os resultados os diferentes estádios de maturação não afetaram significativamente ($p \leq 0,05$) os compostos fenólicos totais, a catequina e o ácido L-ascórbico. Para os compostos fenólicos individuais ao longo do desenvolvimento dos frutos, os derivados do ácido benzóico aumentaram, o mesmo comportamento ocorre com a epicatequina, que dentre todos é o composto de maior concentração, os teores dos derivados do ácido cinâmico apresentaram um comportamento diferenciado, houve queda destes teores. As antocianinas aumentaram ao longo da maturação do fruto, destacando a cianidina-3-glicosídeo. Os carotenóides e os tocoferóis decresceram no decorrer da maturação. Pode-se concluir que é possível montar um perfil fitoquímico da amora-preta cv. Tupy, cultivada em clima temperado, para diferenciar seus estádios de maturação, porém é necessária a realização de diversas determinações, uma vez que não é possível afirmar qual avaliação contribuiu em maior parte para a diferenciação dos estádios ao longo da maturação. Outra observação, diz respeito à atividade antioxidante que aumentou ao longo da maturação, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, contudo foi observado que não é possível determinar qual composto tem maior capacidade antioxidante isoladamente, mas sim foi verificado que há um sinergismo entre os compostos fitoquímicos presentes no fruto, que variam ao decorrer do seu desenvolvimento. Da mesma maneira, não podemos afirmar se houve um aumento na atividade antimicrobiana ao decorrer da maturação, e nem se houve um composto secundário específico responsável por esta atividade antimicrobiana, mas sim que esta existe, uma vez que a bactéria *Salmonella* Enteritidis mostrou sensibilidade aos extratos, porém com diferentes respostas.

Palavras-chave: amora-preta, estádios de maturação, compostos fenólicos, antocianinas, ácido L-ascórbico, carotenóides, tocoferóis, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

Abstract

AZEVEDO, Miriane Lucas. **Perfil fitoquímico, atividades antioxidante e antimicrobiana de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy em diferentes estádios de maturação cultivada em clima temperado.** 2011. 75f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Blackberry (*Rubus fruticosus*) is considered a fruit rich in the phytochemical compounds, mainly phenolic acids and anthocyanins, which have a high potential for antioxidant and are also present L-ascorbic acid, carotenoids and tocopherols. Based on the concentration changes that these compounds undergo during the fruit ripening stages, this work aims to study the changes in the phytochemical profile of blackberry cv. Tupy, grown in temperate climates, in Pelotas, and effects on antioxidant and antimicrobial activity. Were determined five stages of ripening from green to mature through the external color of the fruit, and to confirm the differences between them, each stage was measured physical-chemical, determining total acidity (TA), total soluble solids (SS), ripening index (SS/TA) and instrumental analysis of color (hue angle). With regard to the phytochemical profile were analyzed phenolic compounds, L-ascorbic acid, carotenoids and tocopherols. It can be stated that according to the results of the different ripening stages did not affect significantly ($p \leq 0.05$) the total phenolic compounds, catechin and L-ascorbic acid. For the individual phenolic compounds during the fruit development, the derivatives of benzoic acid increased, the same behavior occurs with epicatechin, that among these is composed of higher concentration, the levels of cinnamic acid derivatives showed a different behavior, there fall of these levels. Anthocyanins increased during the fruit ripening, detaching the cyanidin-3-glucoside. The carotenoids and tocopherols decreased during ripening. One can conclude that it is possible to mount a phytochemical profile of blackberry cv. Tupy, grown in temperate climates, to differentiate their ripening stages, but it is necessary to carry out several determinations, since it is not possible to say which assessment contributed most to the differentiation of stages along the ripening. Another observation concerns the antioxidant activity increased during ripening, *in vitro* and *in vivo*, but noted that it is not possible to determine which compound has a higher antioxidant capacity in isolation, but found that there was a synergism between the phytochemical compounds present in fruit, which vary over the course of its development. Likewise, we can not say if there was an increase in antimicrobial activity over the course of ripening, and even if there was a specific secondary compound responsible for this antimicrobial activity, but that it exists, since the bacterium *Salmonella enteritidis* showed sensitivity to the extracts but with different answers.

Keywords: blackberry, ripening stages, phenolic compounds, anthocyanins, L-ascorbic acid, carotenoids, tocopherols, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas químicas: (a) ácido gálico; (b) ácido elágico; (c) ácido p-hidroxibenzóico; (d) ácido cafeico; (e) ácido p-cumárico; (f) ácido ferúlico	19
Figura 2: Estrutura genérica dos flavonóides	19
Figura 3. Estrutura química de uma antocianidina e possíveis substituintes	21
Figura 4. Estrutura do ácido L-ascórbico	21
Figura 5. Oxi-redução do ácido L-ascórbico	22
Figura 6. Estrutura do β -caroteno	23
Figura 7. Estrutura química das principais moléculas carotenóides	24
Figura 8. Estruturas de moléculas de tocoferóis	25
Figura 9. Amora-preta (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy em diferentes estádios de maturação (P1, P2, P3, P4 e P5)	31

Lista de Tabelas

Tabela 1. Programa do gradiente de eluição dos solventes para separação de compostos fenólicos individuais em amora-preta (<i>Rubus fruticosus</i>)	35
Tabela 2. Programa do gradiente de eluição dos solventes para separação de antocianinas individuais em amora-preta (<i>Rubus fruticosus</i>)	36
Tabela 3. Programa de gradiente de eluição dos solventes na determinação de ácido L-ascórbico em amora-preta (<i>Rubus fruticosus</i>)	37
Tabela 4. Programa do gradiente de eluição dos solventes para separação de carotenóides individuais em amora-preta (<i>Rubus fruticosus</i>)	38
Tabela 5. Programa do gradiente de eluição dos solventes na separação de tocoferóis individuais em amora-preta (<i>Rubus fruticosus</i>)	39
Tabela 6. Coordenadas de cor e ângulo hue (H°) em amoras-pretas (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPEL, Pelotas-RS, 2008/2009)	43
Tabela 7. Determinações físico-químicas em amoras-pretas (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPEL, Pelotas-RS, 2008/2009)	44
Tabela 8. Fenóis totais em amoras-pretas (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPEL, Pelotas-RS, 2008/2009)	46
Tabela 9. Compostos fenólicos individuais (Ácido gálico, Ácido p-hidroxibenzóico, Ácido elágico, Ácido cafeico, Catequina, Epicatequina, Ácido p-cumárico, Ácido ferúlico e somatório) em amoras-pretas (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPEL, Pelotas-RS, 2008/2009)	48
Tabela 10. Determinações de ácido L-ascórbico em amoras-pretas (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPEL, Pelotas-RS, 2008/2009).....	51
Tabela 11. Antocianinas totais (mg Cy-3-glc equivalente.100g ⁻¹) em amoras-pretas (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPEL, Pelotas-RS, 2008/2009) .	52
Tabela 12. Antocianinas individuais (Cianidina-3-glicosídeo + Cianidina-3-rutinosídeo, Peonidina, Delfinidina e somatório das antocianinas individuais) em amoras-pretas (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPEL, Pelotas-RS, 2008/2009)	54

Tabela 13. Carotenóides totais em amoras-pretas (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009)	55
Tabela 14. Carotenóides individuais (luteína+zeaxantina, licopeno, β -caroteno e somatório dos carotenóides individuais) em amoras-pretas (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009)	56
Tabela 15. Tocoferóis (alfa, delta, gama+beta e total) em amoras-pretas (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009)	57
Tabela 16. Capacidade antioxidante em percentual de inibição e em equivalente de Trolox - TEAC ($\text{mM} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de amostra) após 30 minutos de reação em amoras-pretas (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009)	59
Tabela 17. Sobrevivência de leveduras (%) em presença de extratos de amoras-pretas (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009) .	61
Tabela 18. Inibição da bactéria <i>Salmonella</i> em presença de extratos de amoras-pretas (<i>Rubus fruticosus</i>) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009) .	63

Sumário

1. Introdução	13
2. Revisão de literatura	15
2.1. Amora-preta (<i>Rubus fruticosus</i>)	15
2.2. A maturação e os compostos fitoquímicos	16
2.3. Compostos fenólicos	18
2.4. Ácido L-ascórbico	21
2.5. Carotenóides	22
2.6. Tocoferóis	24
2.7. Atividade antioxidante e os compostos fitoquímicos	25
2.8. Atividade antimicrobiana e os compostos fitoquímicos	28
3. Material e métodos	30
3.1. Material vegetal	30
3.2. Reagentes químicos	31
3.3. Métodos	32
3.3.1. Avaliação instrumental da cor	32
3.3.2. Avaliações físico-químicas gerais	32
3.3.3. Determinação dos compostos fenólicos totais	32
3.3.4. Determinação de antocianinas totais	33
3.3.5. Determinação dos carotenóides totais	33
3.3.6. Avaliações cromatográficas	34
A. Determinação de compostos fenólicos individuais	34
B. Determinação de antocianinas individuais	35
C. Determinação do ácido L-ascórbico	37

D. Determinação de carotenóides individuais	38
E. Determinação de tocoferóis	39
3.3.7. Determinação da atividade antioxidante	40
A. Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	40
B. Determinação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	41
3.3.8. Atividade antimicrobiana	41
3.3.9. Análise estatística	42
4. Resultados e discussão	43
5. Conclusão	65
6. Referências bibliográficas	66
Apêndice I	75

1. Introdução

A mudança no hábito alimentar da população brasileira tem criado uma enorme demanda para a produção de frutas frescas. A produção nacional das principais espécies frutíferas de clima temperado é insuficiente para atender a demanda interna, gerando uma crescente necessidade de importação de frutas que podem ser produzidas no Brasil. Tal situação propicia enormes possibilidades de mercado para a produção de frutas frescas e industrializadas no país.

A região sul do Brasil tem se destacado pelo potencial produtor de frutas nativas, como pitanga, e pequenas frutas, destacando-se as do gênero *Rubus*, em especial a amora-preta, devido às condições climáticas e adaptação de espécies, levando à produção da fruta *in natura* e seus produtos derivados.

Além dos nutrientes essenciais e dos micronutrientes, as frutas contribuem com diversos componentes oriundos de metabólicos secundários, compostos estes de grande importância para a fisiologia da planta e seus frutos, pois inibem danos celulares. O consumo de frutas e hortaliças é associado ao baixo risco de incidência e mortalidade por enfermidades degenerativas não transmissíveis, devido à presença destes compostos fitoquímicos.

Frutos da espécie *Rubus* (spp) destacam-se pelo seu aspecto nutricional e potencial funcional devido à ocorrência de fitoquímicos fenólicos; as classes de maior significância são os flavanóides (flavonóis, flavanóis e antocianinas) e ácidos fenólicos. Esses compostos naturalmente presentes em frutas e outros vegetais apresentam uma série de efeitos bioquímicos e antioxidantes que justificam a sua importância na dieta humana. Estudos afirmam que os fitoquímicos fenólicos atuam como protetores de sistemas biológicos, influenciando na capacidade de transferência de radicais livres, agindo como sequestrante de metais e ativadores de

enzimas antioxidantes; atuando diretamente na inibição do estresse oxidativo e danos celulares e do DNA.

Logo, a proteção à saúde está intimamente ligada à capacidade antioxidante que estes compostos fitoquímicos apresentam, individual e/ou sinergicamente, de tal forma que inibem diversas enfermidades degenerativas como: câncer, arteriosclerose, diabetes, processos inflamatórios, doenças neurodegenerativas, entre outras (ACOSTA-MONTOYA et al., 2010; KONKA & KARADENIZ, 2009; PANTELIDIS et al., 2007; ELISIA et al., 2007; MOTA, 2006; ZADERNOWSKI et al., 2005; GARCIA-ALONSO et al., 2004; SIRIWOHARN et al., 2004). Estes compostos podem apresentar ainda, atividades antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana e antineoplásica (KUSKOSKI et al., 2005).

Sabe-se que amora-preta é um fruto não climatérico, que apresenta curta vida de prateleira e que possui processos bioquímico-fisiológicos da maturação ainda não conhecidos, em especial no seu metabolismo secundário. Espera-se que seja possível através do perfil fitoquímico diferenciar os estádios de maturação; que as atividades antioxidante e antimicrobiana aumentam à medida que aumenta a biossíntese dos compostos fitoquímicos no decorrer da maturação; e que os compostos fenólicos individuais tenham maior efeito sobre as atividades antioxidante e antimicrobiana.

Muitos estudos estão sendo realizados no intuito de comprovar as propriedades antioxidantes das amoras-pretas cultivadas em clima temperado, porém pouco se sabe sobre as mudanças que estes compostos sofrem durante os estádios de maturação do fruto, enquanto ligado à planta. Visando elucidar essas mudanças que ocorrem durante o crescimento do fruto, este trabalho objetiva estudar as alterações na composição e no conteúdo de compostos fenólicos totais e individuais, carotenóides totais e individuais, tocoferóis totais e individuais, ácido L-ascórbico e na capacidade antioxidante e na atividade antimicrobiana da amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy cultivada em clima temperado, na região de Pelotas-RS.

2. Revisão de literatura

2.1. Amora-preta (*Rubus fruticosus*)

O gênero *Rubus* compreende cerca de 500 espécies altamente heterozigotas e também híbridas, que possuem ampla adaptação climática. Dentre as espécies de maior interesse agrônômico deste gênero destacam-se *Rubus idaeus* (framboesa) e a *Rubus fruticosus* (amora-preta), ambas pertencentes à família *Rosaceae* (ANTUNES, 2002).

A amoreira-preta, que dá origem a amora-preta (*blackberry*) designada como “pequena fruta”, consiste em um grupo variado e complexo de plantas. É uma espécie arbustiva de porte ereto ou rasteiro, que produz frutos agregados, denominados mini drupa ou drupete, onde existe uma pequena semente, pesando cerca de 4 a 7 gramas de coloração negra e sabor ácido à doce-ácido (ANTUNES, 2002).

A sua cultura foi introduzida no Rio Grande do Sul em 1972, e tem alcançado excelente adaptação e alta produtividade, a considerar as condições climáticas desta região que permite ofertar frutas das espécies de clima temperado (ANTUNES, 2002).

Dentre as várias espécies frutícolas com boas perspectivas de cultivo e comercialização, a amoreira-preta (*Rubus* spp) surge como uma das mais promissoras. Esta é uma das espécies que têm apresentado sensível crescimento de área cultivada nos últimos anos no Rio Grande do Sul, atualmente o maior produtor nacional, com aproximadamente 700 t.ano⁻¹, e apresentando potencial para os demais estados de características climáticas semelhantes. Dentre as principais cultivares de amora-preta testadas e adaptadas às condições do sul do país,

destaca-se a cultivar 'Tupy', que é atualmente a cultivar mais plantada no país. É resultado do cruzamento realizado em 1982, entre 'Uruguai' e 'Comanche'. As plantas são de porte ereto, vigorosas, com espinhos, os frutos têm 8 a 10g de peso médio, sabor equilibrado (acidez/açúcar), com teor de sólidos solúveis entre 8-9°Brix. A colheita, nas condições de Pelotas, ocorre entre meados de novembro a início de janeiro (RASEIRA & ANTUNES, 2004).

A amora-preta *in natura* é altamente nutritiva, contendo 85% de água, 10% de carboidratos, com elevado conteúdo de minerais (destacando-se o cálcio e o potássio), sendo apontada como de interesse na prevenção à osteoporose e como tônico muscular durante práticas esportivas, além de conter vitaminas A, B e C (BYAMUKAMA et al., 2005; RASEIRA & ANTUNES, 2004).

A amora-preta, assim como os demais pequenos frutos (*berries*), apresentam-se como uma importante fonte de alguns fitoquímicos, os quais atuam como agentes promotores da saúde. Uma série de funções e constituintes químicos são relatados na literatura relacionados às qualidades destes frutos, entre eles os compostos fenólicos, destacando-se os ácidos fenólicos, antocianinas, pro-antocianinas e outros flavonóides, que são considerados potentes agentes antioxidantes (ZADERNOWSKI et al., 2005). A capacidade antioxidante da amora-preta, em sua maior parte, se deve aos compostos fenólicos, porém esta fruta possui certa quantidade de carotenóides, tocoferóis e, ainda, o ácido L-ascórbico, que em sinergia com os componentes majoritários contribuem para este potencial (IGNARRO et al., 2007; FRANKE, et al., 2004; LEE & KADER, 2000).

2.2. A maturação e os compostos fitoquímicos

Segundo Antunes et. al. (2006), o conhecimento da fisiologia pós-colheita de um fruto é de grande importância para que se tenha subsídio técnico que vise à ampliação do tempo de armazenamento, sem alteração de qualidade.

Para melhor compreender os processos bioquímico-fisiológicos da maturação, estudos buscam correlacionar os compostos secundários com as respostas fisiológicas e tecnológicas nos produtos. De acordo com Speirs e Brady (1991), o amadurecimento de frutas envolve uma série de complexas reações bioquímicas, como a hidrólise do amido, a produção de carotenóides, de antocianinas e de compostos fenólicos, além da formação de vários compostos voláteis.

Com relação aos processos bioquímicos-fisiológicos da maturação, Morris et. al. (1981) mencionam que, devido a estrutura frágil e alta taxa respiratória de frutas de amoreira-preta, sua vida pós-colheita é relativamente curta, o que também é corroborado por Hardenburg et. al. (1986), citados por Perkins-Veazie et. al. (1997). Estes mesmos autores citam Clark (1992) quando relatam que a firmeza do fruto colhido influencia na vida de prateleira, uma vez que podem ser facilmente danificados no manuseio facilitando a infecção por patógenos.

Fatores genéticos e de meio ambiente, tais como cultivar, maturação, exposição à luz UV e método de colheita, tem um importante papel na composição das pequenas frutas. Em nível de fenóis e capacidade antioxidante de amoras-pretas pode estar sendo influenciada pela maturação, além da natureza das antocianinas individuais, dos fenóis individuais, teores de ácido L-ascórbico presentes (FERREYRA et al., 2007; BYAMUKAMA, et. al., 2005; SIRIWOHARN et. al., 2004; LEE & KADER, 2000). Por estas razões, faz-se necessário um estudo fitoquímico das mesmas, a fim de elucidar os processos bioquímicos-fisiológicos da maturação e as rotas biossintéticas envolvidas nestes processos.

A síntese destes compostos com propriedades bioativas se torna importante na fisiologia de plantas e frutas, pois eles atuam na proteção contra o oxigênio livre e de radicais metabólicos causadores de uma série de danos celulares (AGAR et al., 1997).

Ferreira et. al. (2007), trabalharam com morangos cv. Selva, identificando e caracterizando a capacidade antioxidante e o conteúdo de diferentes compostos como ácido L-ascórbico, fenóis totais, antocianinas totais ao longo da maturação deste fruto. Os autores alegam que a oferta de cultivares de morango no mercado mundial é altamente dinâmica, e é uma estratégia útil saber o máximo de informações possíveis sobre suas características de qualidade, incluindo a composição nutricional. Este conhecimento pode contribuir para avaliar e selecionar as práticas de cultivo mais adequadas e atribuir o melhor uso (mercado de frescos, processamento industrial, etc) para cada material. O morango é um dos mais importantes representantes deste grupo de pequenos frutos, não-climatéricos, além deste, destacam-se a framboesa, o mirtilo e a amora-preta (ANTUNES et. al., 2003) para os quais também se justifica a identificação e caracterização dos compostos fitoquímicos presentes ao longo da maturação.

2.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas e, devido a sua diversidade química, possuem várias funções nos vegetais, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, defesa contra herbivoria e patógenos, suporte mecânico, pigmentação, como atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos, além de se formarem em condições de estresse, como infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (ANGELO e JORGE, 2007; TAIZ & ZEIGER, 2004; SELLAPPAN et al., 2002).

Basicamente são substâncias formadas pelo anel benzênico com grupos hidroxilas associados diretamente à estrutura cíclica. Esses compostos são sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico. A rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota da pentose fosfato em aminoácidos aromáticos, mais precisamente a fenilalanina de onde derivam a maior parte dos compostos fenólicos secundários. A rota do ácido mevalônico embora seja uma fonte importante de produtos secundários fenólicos em fungos e bactérias, é menos significativa em plantas superiores (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Os compostos fenólicos são classificados de acordo com seu esqueleto básico, podendo ser divididos em: ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico, derivados do ácido cinâmico), cumarinas, flavonóides e derivados de polimerização (taninos e ligninas), os quais representam os compostos fenólicos amplamente distribuídos na natureza.

A amora-preta apresenta-se como uma fonte importante de compostos fenólicos bioativos, destacando-se a presença das antocianinas, cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo; dos flavonóis, quercetina e kaempferol; dos flavanóis, catequina e epicatequina; e dos ácidos fenólicos, ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido elágico e ácido gálico (MÄÄTÄ-RIIHINEN et al., 2004; SIRIWOHARN et al., 2004).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por possuir um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. Estão divididos em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico, que tem estrutura comum C6-C1 (como exemplo os ácidos p-hidroxibenzóico, gálico e seu dímero de condensação elágico, vanílico e siríngico), e derivados do ácido

hidroxicinâmico, que são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral com estrutura C6–C3 (os mais comuns são os ácidos caféico, ferúlico e p-cumárico) (Figura 1) (ANGELO e JORGE, 2007).

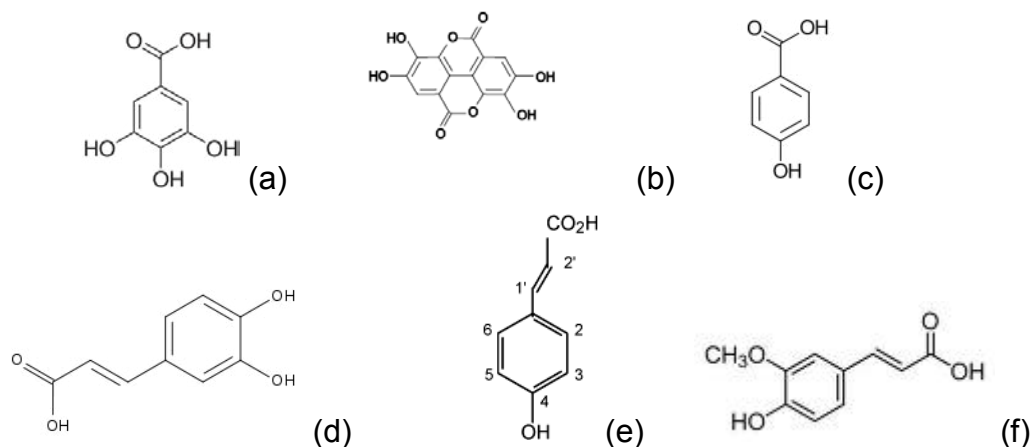


Figura 1. Estruturas químicas: (a) ácido gálico; (b) ácido elágico; (c) ácido p-hidroxibenzóico; (d) ácido cafeico; (e) ácido p-cumárico; (f) ácido ferúlico.

Fonte: Imagens GOOGLE, 2011.

O ácido elágico ($C_4H_6O_8$) apresenta-se como um dos ácidos fenólicos de maior relevância, e tem sido reportado em vários estudos pela sua representabilidade em frutos de amora-preta. Este composto é um hidrólito da elagitanina, produto da condensação do ácido gálico, que pode estar presente nas plantas na forma de ácido elágico livre, de ácido elágico glicosídeo ou de elagitaninas, que é a mais comum (MATTILA & KUMPULAINEN, 2002; ZAFRILLA, FERRERES & TOMÁS-BARBERÁN, 2001; HÄKKINEN et al., 2000).

Os flavonóides são os que apresentam a estrutura química descrita como C6-C3-C6, que consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C, possuindo hidroxilas e glicosídeos distribuídas ao redor (Figura 2) (ANGELO e JORGE, 2007).

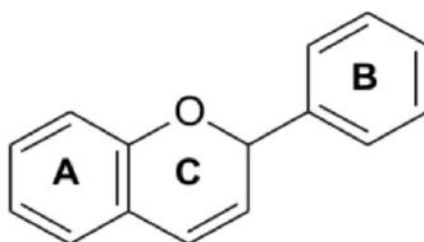


Figura 2: Estrutura genérica dos flavonóides.

Fonte: ANGELO e JORGE, 2007.

Variações na estrutura dos flavonóides acabam subdividindo este grupo em flavonol, flavona, flavanol e isoflavonas. Em comum, esses quatro grupos possuem hidroxilas ligadas nas posições 5 e 7 do anel A. Os flavonóis, como a quercetina e o kaempferol, possuem uma hidroxila na posição 3 e grupamento carboxila na posição 4 (anel C). Flavonas, como luteolina, são semelhantes aos flavonóis, porém sem a hidroxila ligada na posição 3. Os flavanóis, como catequina, não possuem a dupla ligação com oxigênio no anel C, mas possuem uma hidroxila na posição 3. E isoflavonas, como genisteína, apresentam o anel B ligado no carbono da posição 3 do anel C (RICE-EVANS et al., 1997).

O grupo mais comum dos flavonóides pigmentados consiste das antocianinas, que se caracterizam por um dos grupos de pigmentos mais largamente distribuídos na natureza (TAIZ & ZEIGER, 2004). São os componentes de muitas frutas vermelhas e hortaliças escuras, apresentando grande concentração nas cascas. Seu espectro de cor vai do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons de púrpura (VOLP et al., 2008).

Em geral, os flavonóides ocorrem como glicosídeos, o que torna a molécula menos reativa contra radicais livres, porém mais solúvel em sistemas aquosos, permitindo, portanto, o armazenamento no vacúolo da célula (VOLP et al., 2008). A glicosilação proporciona estabilidade e solubilidade a estes pigmentos, podendo ocorrer em várias posições, sendo observada com maior frequência na posição 3 do anel C. Como produtos da hidrólise das antocianinas obtém-se o componente glicídico e a aglicona, denominadas antocianidina (CABRITA, LAUREANO e SILVA, 2003; SKREDE & WROLSTAD, 2000).

Muitas combinações de tipos, número e posição do açúcar substituinte são possíveis de serem encontradas nas estruturas das antocianinas, assim, uma ampla variedade tem sido identificada. Dentre as antocianidinas encontradas na natureza, apenas seis estão presentes nos alimentos: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina, que diferem entre si quanto a o número de hidroxilas e ao grau de metilação no anel B (Figura 3) (LIMA e GUERRA, 2003).

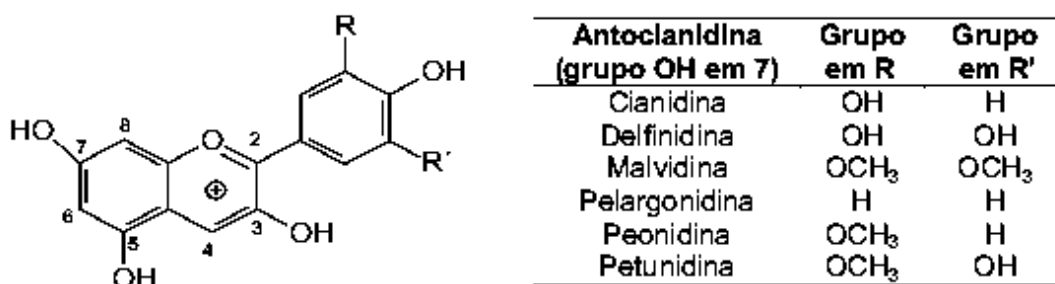


Figura 3. Estrutura química de uma antocianidina e possíveis substituintes.

Fonte: LIMA & GUERRA, 2003.

2.4. Ácido L-ascórbico (Vitamina C)

A vitamina C é um importante componente de qualidade em muitas frutas, particularmente nas pequenas frutas e é também um constituinte essencial na dieta humana, atuando na prevenção do escorbuto, manutenção saudável da pele e vasos sanguíneos, formação do colágeno, absorção de ferro inorgânico, proteção contra a progressão de arteriosclerose e redução do nível de colesterol. O ácido L-ascórbico (Figura 4) é a forma biologicamente mais ativa da vitamina C e apresenta forte capacidade antioxidante (ELLINGSEN et al., 2009; PANTELIDIS et al. 2007; BURDULU et al., 2006).

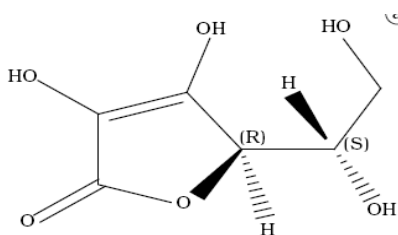


Figura 4. Estrutura do ácido L-ascórbico

Fonte: ROSA et al., 2007.

Os processos de degradação do ácido ascórbico, que podem ocorrer por via anaeróbica e aeróbica, dependem de fatores como da concentração de oxigênio, calor, luz, temperatura e tempo de estocagem (BURDULU et al., 2006). A forma inicial, resultante da oxidação reversível da vitamina C, é o ácido deidroascórbico

(DHA), que é a forma oxidada do ácido ascórbico (AA) e possui 80% da atividade biológica de seu precursor não oxidado (Figura 5) (HERNÁNDEZ et al. 2006).

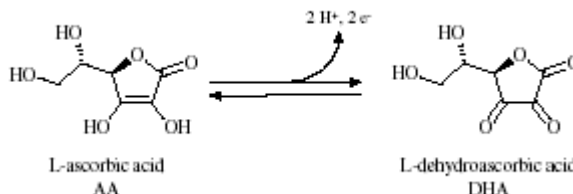


Figura 5. Oxi-redução do ácido L-ascórbico.

Fonte: SILVA et al., 2006.

A vitamina C, ou ácido L-ascórbico, é uma vitamina hidrossolúvel e termolábil. O ácido L-ascórbico é amplamente distribuído nos vegetais e em produtos de origem vegetal, sendo encontrado, principalmente, em frutas cítricas e hortaliças folhosas (ZHANG & HAMAUZU, 2004). Segundo Lee & Kadder (2000), a amora-preta apresenta conteúdos inferiores desta vitamina (cerca de $18 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) quando comparada as demais frutas deste estudo.

A acidez da vitamina C é justificada primeiramente devido à extensão da conjugação da carbonila presente no carbono 1, aumentando a característica ácida da hidroxila no carbono 3. A hidroxila no carbono 2 faz parte de um enol e sua acidez é pouco maior que a do fenol (ROSA et al., 2007).

O teor de vitaminas nas frutas pode variar dependendo da espécie, do estágio de maturação na época da colheita, de variações genéticas, do manuseio pós-colheita, das condições de estocagem e do tipo de processamento (FERREYRA et al., 2007; SILVA et al., 2006; LEE & KADER, 2000).

2.5. Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos que possuem como papel mais proeminente na dieta de seres humanos a capacidade de servir como precursor da vitamina A. O β -caroteno (Figura 6) é o carotenóide que possui a maior atividade pró-vitâmica A (SÁNCHEZ-MORENO et al, 2006; RODRÍGUEZ-AMAYA, 1996).

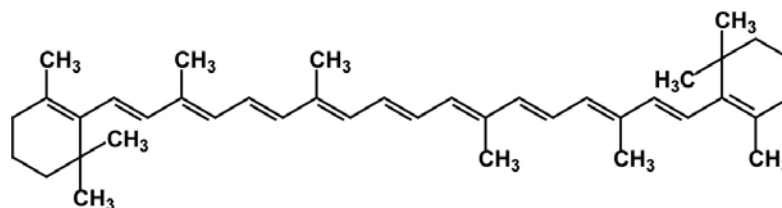


Figura 6. Estrutura do β -caroteno

Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA, 2001.

Os carotenóides são tetraterpenóides de 40 carbonos unidos por unidades opostas no centro da molécula. Ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de duplas ligações, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções com oxigênio ou a combinação destes processos resultam na diversidade de estruturas dos carotenóides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Tanto os carotenóides precursores de vitamina A, assim como os não precursores (como a luteína, a zeaxantina e o licopeno), parecem apresentar ação protetora contra o câncer. Os possíveis mecanismos de proteção são por intermédio do seqüestro de radicais livres, modulação do metabolismo do carcinoma, inibição da proliferação celular, aumento da diferenciação celular via retinóides, estimulação da comunicação entre as células e aumento da resposta imune (OLSON, 1999). Sabe-se que a estrutura dos carotenóides exerce grande influência sobre a atividade antioxidante. Por exemplo, cataxantina e astaxantina apresentam melhores atividades antioxidantes que β -caroteno ou zeaxantina. A atividade antioxidante aumenta com o aumento do número de duplas ligações conjugadas, grupos cetona e presença do anel ciclopentano em sua estrutura (Figura 7) (UENOJO et al., 2007).

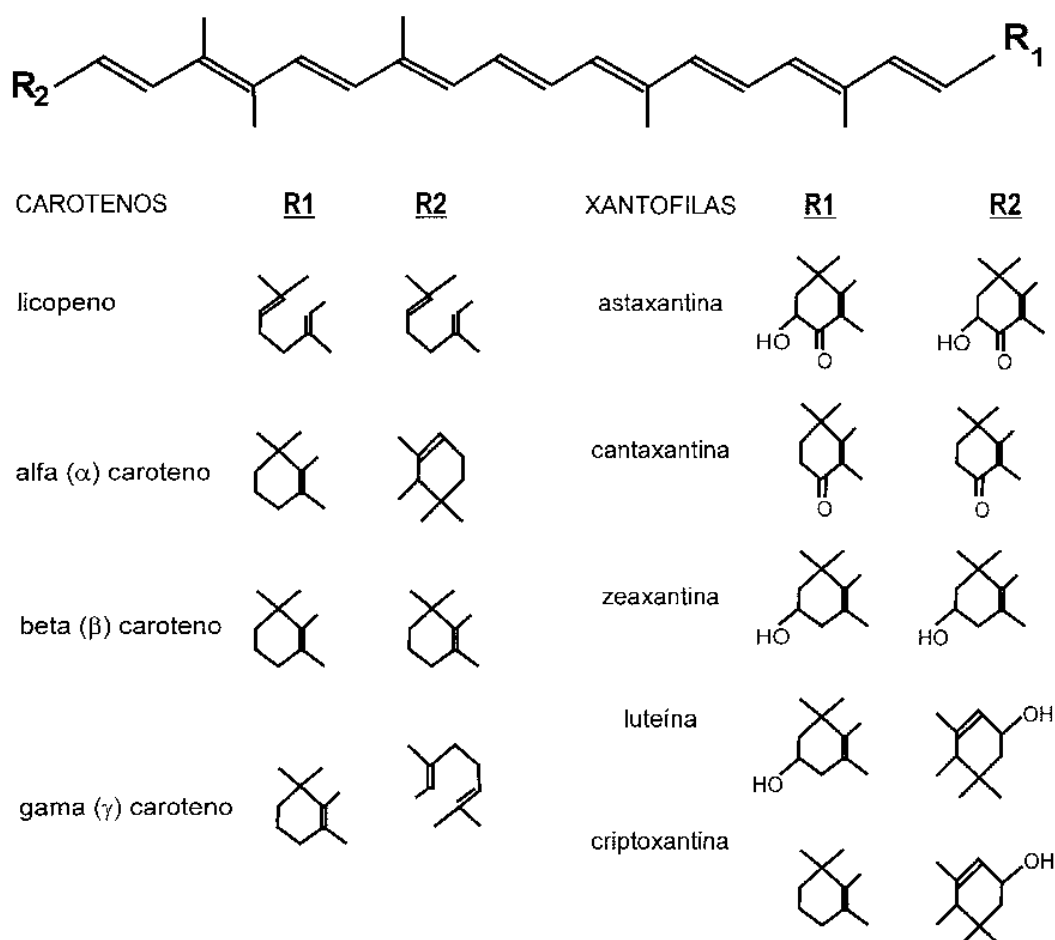


Figura 7. Estrutura química das principais moléculas carotenóides.

Fonte: Imagens GOOGLE, 2011.

Nas plantas os carotenóides desempenham um papel fundamental como pigmento acessório na fotossíntese, agindo como coletor de energia e protetor contra foto-oxidação (SILVA & MERCADANTE, 2002; KRINSKI, 2001).

Os carotenóides exercem ações relacionadas à redução do risco de doenças degenerativas, como prevenção da formação de catarata, redução da degeneração macular relacionada ao envelhecimento e redução do risco de doenças coronárias (KRINSKI, 2001).

2.6. Tocoferóis

Os tocoferóis, precursores da vitamina E, pertencem ao grupo dos terpenóides, constituindo um importante grupo na dieta humana, estando vinculados às funções biológicas gerais, incluindo a atividade vitamínica, capacidade

antioxidante, modulação da função imune e regulação da diferenciação e proliferação celular (GRANADO-LORENCIO et al., 2007).

Os tocoferóis (Figura 8) ocorrem naturalmente em praticamente todos os vegetais, principalmente nos verde-escuros, nas sementes oleaginosas, nos óleos e no germem de trigo. A ocorrência natural dos diferentes compostos que fazem parte da vitamina E diferenciam-se entre os vegetais, mas o α - tocoferol tem ocorrência mais comum (SETIADIA, 2003).

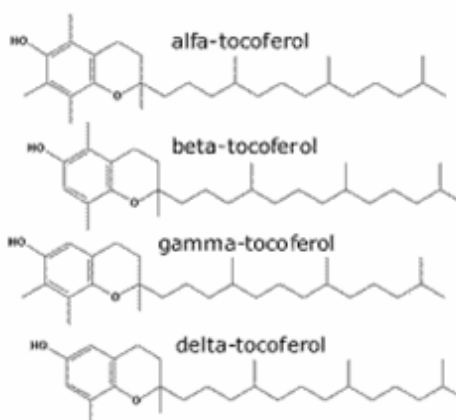


Figura 8. Estruturas de moléculas de tocoferóis.

Fonte: Imagens GOOGLE, 2011.

A vitamina E é considerada como fator de proteção de aproximadamente oitenta tipos de enfermidades, como câncer, doenças cardiovasculares, entre outras. O α -tocoferol é a forma mais comum de vitamina E presente na natureza, e é a sua forma mais biologicamente ativa. Este tocoferol consiste na principal vitamina com capacidade antioxidante transportada através da corrente sanguínea pela fase lipídica das partículas lipoprotéicas. Junto com o beta-caroteno e outros antioxidantes naturais, chamados ubiquinonas, a vitamina E protege os lipídios da peroxidação *in vivo* (CHING & MOHAMED, 2001).

2.7. Atividade antioxidante e os compostos fitoquímicos

A avaliação de "pequenas frutas" como fonte de compostos bioativos quanto a sua ação antioxidativa, está associada a fatores relacionados a absorção, distribuição, metabolismo e excreção do organismo (MÄÄTTÄ-RIIHINEN et al.,

2004). A funcionalidade destes compostos baseia-se em sua ação como inibidor de radicais livres e como seqüestrante de enzimas e metais, os quais estariam envolvidos em alterações fisiológicas como aterosclerose, cataratas, câncer, patologias cerebrais e inflamações crônicas (ZADERNOWSKI et al., 2005; GARCIA-ALONSO et al., 2004; SIRIWOHARN et al., 2004; SELLAPPAN et al., 2002).

Os polifenóis, juntamente com outros compostos redutores presentes na dieta humana, tais como vitamina C, vitamina E e carotenóides, protegem os tecidos do corpo contra o estresse oxidativo e de patologias associadas com cânceres, doenças coronarianas e inflamações (TAPIERO, 2002).

Os compostos antioxidantes, presentes nas frutas e hortaliças atuam nas espécies reativas de oxigênio, que incluem radicais livres reativos, tais como superóxidos, hidroxilas e peroxila, e também com não radicais, como peróxido de hidrogênio. Estas substâncias atuam na etapa de iniciação e propagação dos radicais livres ou supressão da formação dos mesmos (LIM, LIM & TEE, 2007).

A atividade antioxidante desses polifenóis é determinada pela capacidade de seqüestrar radicais livres, oxigênio singlete e algumas vezes como quelantes de metais, podendo também atuar em conjunto com outras moléculas antioxidantes (SOARES, 2002). A habilidade dos compostos fenólicos de serem antioxidantes depende de sua estrutura química, sendo que os principais grupamentos responsáveis são: a) a fração orto 3',4'- dihidroxi no anel B (como exemplo a catequina e quercetina); b) a fração 5,7-dihidroxi no anel A (como exemplo o kaempferol); c) a dupla ligação entre as posições 2 e 3 combinadas com o grupo carboxílico na posição 4 do anel C, que provocam ressonância. Entretanto, alterações nos arranjos dos grupos hidroxilas e substituições por glicosilação acabam diminuindo a atividade antioxidante (RICE-EVANS et al., 1997).

Os ácidos fenólicos tem atuação semelhante aos flavonóides, seqüestrando radicais livres como principal forma de atuação como antioxidantes. Os ácidos hidroxicinâmicos são mais ativos em relação à atividade antioxidante do que os ácidos hidroxibenzóicos. Isso se deve à dupla ligação do radical presente na molécula dos derivados do ácido hidroxicinâmico, que participa da estabilidade do radical por ressonância do deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica (ANGELO e JORGE, 2007).

A atividade antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos também é maior por possuírem grupamentos metoxila em sua estrutura. A presença de uma metoxila adjacente à hidroxila, como ocorre no ácido ferúlico, aumenta o período de indução da oxidação duas vezes em relação a um controle sem antioxidante. Este decurso de tempo é ainda maior com a presença de duas metoxilas, como ocorre no ácido sináptico. Entretanto, um maior potencial antioxidante é encontrado quando há duas hidroxilas nas posições 3 e 4, estrutura apresentada pelos ácidos caféico e 3,4-dihidroxibenzóico, por exemplo (MARINOVA e YANISHLIEVA, 1992).

Em pesquisas epidemiológicas alguns flavonóides apresentam-se associados com a proteção contra doenças do envelhecimento, possivelmente pela sua ação como antioxidante. A formação de radicais livres pelo oxigênio é supostamente a chave para o desenvolvimento de câncer e doenças coronárias, aliado à função protetora da membrana celular. Radicais livres podem atacar biomoléculas, dentre as quais se destacam os lipídios, as proteínas ou o DNA propriamente dito, os quais podem ser preservados pela ação dos antioxidantes (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

Nos alimentos, o ácido ascórbico possui uma função muito importante, devido à sua ação fortemente redutora. Este composto é amplamente empregado como agente antioxidante para estabilizar cor, sabor e aroma de alimentos. É utilizado ainda como conservador e para o enriquecimento ou restauração, a níveis normais, do valor nutricional perdido durante o processamento (ANGELUCCI et al., 1987).

É sabido que a vitamina C é um antioxidante, possuindo muitas funções biológicas como absorção do ferro inorgânico, redução dos níveis de colesterol do plasma, inibição da formação de nitrosaminas, aumento da imunidade, e por reagir com o oxigênio singlete e outros radicais livres, e estudos afirmam que reduz os riscos de arteriosclerose, outras enfermidades cardiovasculares e algumas formas de câncer (LEE & KADDER, 2000).

Segundo Olson (1999) os carotenóides seqüestram o oxigênio singlete, removem os radicais peróxidos, modulam o metabolismo carcinogênico, inibem a proliferação celular, estimulam a comunicação entre células (junções *gap*), e elevam a resposta imune.

Em sua revisão Pazdro & Burgess (2010) relatam que espécies reativas de oxigênio (EROS) seriam formadas pelo estresse causado pelo excesso de glicose intracelular em pessoas com diabetes tipo 2, causando complicações. Em pacientes

supervisionados, tratados com suplementação de vitamina E esse dano celular (membranas celulares e de partículas lipoprotéicas) teria sido minimizado, uma vez que esse fitoquímico protege contra o dano nas macromoléculas. A função dos tocoferóis como antioxidante na peroxidação das membranas celulares ocorre pelo fornecimento de um átomo de hidrogênio ao radical peróxido formado, agindo como seqüestrante de radicais livres, protegendo assim as membranas celulares de possíveis danos (SIQUEIRA, 1997).

2.8. Atividade antimicrobiana e os compostos fitoquímicos

A atividade microbiana é uma das principais causas de deterioração em alimentos e, muitas vezes, é associada à perda de qualidade e segurança destes. A preocupação com relação a bactérias e fungos patogênicos em alimentos vem crescendo devido ao aumento de surtos de doenças transmitidas por alimentos.

Os extratos de plantas constituem importantes fontes de compostos biologicamente ativos, que podem apresentar importantes propriedades antimicrobianas. Recentemente, o uso de extratos de plantas como agentes com atividade antioxidante e antimicrobiana tem sido de extrema importância, em especial para alimentos, pois podem ser utilizados como aditivos alimentares, fornecendo proteção contra reações oxidativas, além de proteger contra microrganismos deteriorantes e patogênicos (WU et al., 2008).

As frutas são fontes ricas em substâncias bioativas como compostos fenólicos e ácidos orgânicos, que podem apresentar atividade antimicrobiana. Alguns autores estudam as propriedades antimicrobianas de compostos fenólicos e extratos de plantas e frutas contra bactérias patogênicas transmitidas por alimentos (DUNG et al., 2008; KUETE et al., 2008; THITILERTDECHA et al., 2008; WU et al., 2008), evidenciando que os compostos fenólicos são alguns dos principais componentes que fornecem atividade antimicrobiana, muitas vezes agindo sinergicamente entre eles e com outras moléculas extraídas, como carotenóides e ácido ascórbico.

Pesquisas mostram que a atividade antimicrobiana é relacionada à ação antioxidante dos fitoquímicos, que pode variar de acordo com a concentração e o tipo de bactéria a ser estudada. Variações nas estruturas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem causar danos diferenciados quando a bactéria é

submetida a compostos antimicrobianos, pois as diferenças entre esses dois grupos estão, principalmente, nas suas propriedades de permeabilidade das membranas celulares e nos componentes de superfície (MATASYOH et al., 2009; WU et al., 2008; THITILERTDECHA et al., 2008).

A estrutura e a composição química dos compostos fitoquímicos também é importante na ação como agente antimicrobiano. O mecanismo de ação dos componentes fenólicos, que se destaca por possuir característica de hidrofobicidade, que é verificado por sua ação na degradação da parede celular, danos à membrana citoplasmática, ao extravasamento de material celular, à coagulação do citoplasma, e à desregulação do sistema de transporte de íons e elétrons no sistema membranário (BURT et al., 2004).

Publicações relatam as propriedades de vários fitoquímicos, especialmente dos compostos fenólicos presentes em frutas, os quais atuam com eficácia contra infecções causadas por *Helicobacter pylori* e na prevenção de diversas doenças (VATTEM, 2005). Dentre os principais fitoquímicos que apresentariam estas propriedades antibacterianas destacam-se os compostos fenólicos, os tocoferóis e o ácido ascórbico. Martini et al. (2009) em seu trabalho com *Rubus ulmifolius*, onde foram isolados polifenóis de extratos, demonstraram a atividade antibacteriana contra duas cepas do *H. pylori*. Este resultado sugere que o ácido elágico, que mata *H. pylori* por atividade inibidora de arilaminas N-acetyltransferases, é um eficaz agente anti-*H. pylori* que poderia ser usado, junto com antibióticos, para o tratamento de infecções causadas por ambos clones CagA+ e CagA-.

Panizzi et al. (2002) em estudo realizado com *Rubus ulmifolius*, utilizando-se de extratos obtidos através de diferentes solventes, constatou atividade antimicrobiana sobre bactérias e fungos, e que esta tende a aumentar à medida que aumenta a polaridade dos extratos e de alguns componentes isolados, a quercetina, o kaempferol, o ácido gálico e o ácido ferúlico. As frações de ácidos fenólicos e taninos, extraídas utilizando metanol como solvente, mostrou uma alta atividade antimicrobiana.

3. Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Metabólitos Secundários e no Laboratório de Cromatografia de Alimentos - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA) da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS.

3.1. Material vegetal

Os frutos utilizados neste estudo foram amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy, *in natura*, em cinco estádios de maturação diferenciados, cultivados na região de Pelotas-RS (31° 45' S 52° 20' W.GRW), safra 2008/2009, temperatura média do período 21°C, com amplitude térmica média de 8,9°C, precipitação pluviométrica de 45,3mm e insolação total de 468,1 cal.cm⁻².dia⁻¹.

Os frutos foram colhidos manualmente, cerca de 500g de cada ponto de maturação, e transportados até o laboratório, em caixas isotérmicas, então foram selecionados, de acordo com o grau de sanidade visual, lavados, sanitizados (7ppm de cloro) e separados em cinco lotes, de acordo com a homogeneidade da coloração da superfície dos frutos, cada qual representando um estágio de maturação, distinguindo-se: P1- superfície verde; P2- superfície rósea-esverdeada; P3- superfície rósea-vermelhada; P4- superfície vermelho-arrocheada; P5- superfície preto-arrocheada (Figura 9).

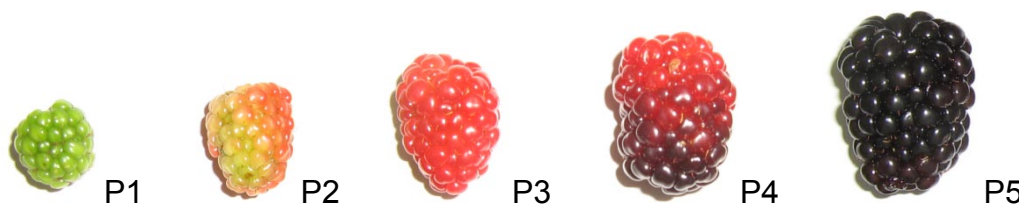


Figura 9. Amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy em diferentes estádios de maturação (P1, P2, P3, P4 e P5).

Fonte: AZEVEDO, M.L., 2008.

Logo, foram separadas amostras para realização das avaliações prévias (acidez titulável total, avaliação instrumental da cor, sólidos solúveis totais), e o restante embalado em sacos de polietileno de alta densidade (0,45 micra), e armazenados separadamente em ultra-freezer a -80°C , até o momento da realização das demais análises. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3.2. Reagentes químicos

Os padrões cromatográficos para a determinação de fenóis individuais foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA) e Fluka (Milwaukee, WI), incluindo: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido elágico, ácido p-hidroxibenzóico, quercetina, campferol, miricetina, (+)catequina e (-) epicatequina; todos com 96-99% de pureza.

Os padrões utilizados para a determinação de tocoferóis foram: α , δ e γ -tocopherol, obtidos da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) com 90-99% de pureza.

Para a determinação de carotenóides utilizou-se padrões de β -cryptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina, obtidos da Chromadex (Irvine, USA); e o β -caroteno obtido da Fluka (Saint Louse, USA), todos com 97% de pureza.

Na determinação de antocianinas todos os padrões utilizados foram provenientes da Fluka (Milwaukee, WI), com pureza maior que 95%, incluindo o cloreto de cianidina, cloreto de pelargonidina, cloreto de malvidina, cloreto de peonidina, cloreto de delfinidina, cloreto de Kuromanina, cloreto de Keracianina e cloreto de malvidina-3-O-galactosideo.

Os padrões cromatográficos para a determinação de ácido ascórbico foram o ácido L-(+)-ascórbico da Synth (Diadema, Brazil), 99% de pureza.

Foram utilizados meios YPD (*Yeast Peptone Dextrose*), Agar, Peptona, MHI (Ágar Miller Hinton), TSA (*Trypticase Soy Agar*) Merck (Germany). Ciprofloxacina. DPPH (2,2-Difenil-1-picrylhidrazil), reagente Folin-Ciocalteu e TROLOX (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-carboxílico) da Sigma (St. Louis, MO, USA).

Os demais reagentes utilizados para a realização das diversas análises foram de grau P.A. ou UV/HPCL espectroscópico.

3.3. Métodos

3.3.1. Avaliação instrumental da cor

A cor foi mensurada instrumentalmente com colorímetro Minolta CR-300 Chroma Meter (Ramsey, USA), os parâmetros medidos foram: L^* , a^* e b^* ; onde L^* indica a luminosidade (0 = preto e 100 = branco) e a^* e b^* representam a cromaticidade ($+a^*$ = vermelho; $-a^*$ = verde; $+b^*$ = amarelo; $-b^*$ = azul). Estes parâmetros foram convertidos em ângulo de cor, $H^\circ = \tan^{-1}b^*/a^*$, indicando o ângulo hue (H°) da amostra (0° ou 360° = vermelho; 90° = amarelo; 180° = verde; 270° = azul) (ZHANG et al., 2008).

3.3.2. Avaliações físico-químicas gerais

Acidez titulável total, método volumétrico, com NaOH 0,1N, foi expressa em mg de ácido málico por 100 gramas de fruto (AOAC, 2006).

Sólidos solúveis totais (expresso em °Brix) foi mensurado com refratômetro de Abbé, à 20°C (modelo RM-M3, Atago Co. Ltd., Tokyo, Japão).

O índice de maturação foi obtido através da razão: sólidos solúveis totais/acidez total titulável (ACOSTA-MONTOYA et al., 2010).

3.3.3. Determinação de compostos fenólicos totais

Compostos fenólicos totais foram determinados por espectrofotômetro pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLENTON & ROSSI, 1965). Segundo o método, pesou-se 2g de amostra triturada, dilui-se em 20 mL de metanol, manteve-se o macerado em um banho-maria a 25°C, durante 3 horas, filtrou-se com algodão para

um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com metanol. Fez-se a reação colorimétrica para quantificação, tomando-se 1 mL de extrato e adicionando 10 mL de água e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, deixando reagir por 3 minutos, adicionou-se 1,5 mL de carbonato de sódio 20%, deixou-se reagir por 2 horas e, logo, fez-se a leitura da absorbância da amostra em espectrofotômetro (*Ultrospect® 2000 UV/Visível Pharmacia*), utilizando comprimento de onda 765 nm.

Foi construída uma curva padrão de ácido gálico para realizar a quantificação dos fenóis expressa em mg de ácido gálico.100g⁻¹ de amostra. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente em ácido gálico por 100 gramas de peso de fruto *in natura*.

3.3.4. Determinação de antocianinas totais

O conteúdo de antocianinas totais foi determinado por espectrofotômetro segundo método de Less e Francis (1972), com algumas modificações, onde pesou-se 1 g de amostra macerada, acrescentou-se 25 mL de etanol acidificado (HCl até pH 1,0) e deixou-se o macerado em repouso por 1h, homogeneizando-o, neste intervalo, a cada 5 min (+/-). Após, filtrou-se com algodão e completou-se o volume com etanol, para 50 mL em balão volumétrico. Fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (*Ultrospect® 2000 UV/Visível Pharmacia*) no comprimento de onda de 520 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de cianidina-3-glicosídeo por 100 gramas de fruto *in natura*.

3.3.5. Determinação de carotenóides totais

O conteúdo de carotenóides totais foi determinado segundo método de Rodriguez-Amaya (1999), Triturou-se a amostra com celite, extraiu-se com acetona gelada, e após foi feita uma filtração a vácuo e lavagem com acetona gelada, até total remoção do pigmento. Após a etapa de extração, o pigmento foi transferido para um funil de separação, onde foi adicionado éter de petróleo e água até a completa remoção da acetona. Foi realizada a leitura da absorbância do extrato etéreo em espectrofotômetro (*Ultrospect® 2000 UV/Visível Pharmacia*), no comprimento de onda de 450 nm. A quantificação foi realizada através da equação a seguir:

$$\text{Carotenóides totais} = \frac{\text{Absorbância} \times \text{vol. do extrato (mL)} \times 10^6}{2500 \times 100 \times \text{g de amostra}}$$

Os resultados foram expressos em miligrama de β -caroteno por 100 gramas de fruto *in natura*.

3.3.6. Avaliações cromatográficas

A. Determinação de compostos fenólicos individuais

Foram quantificados e determinados fenóis individuais segundo método descrito por Häkkinen et al. (1998), com pequenas modificações. A amostra foi extraída com metanol, após foi adicionado ácido clorídrico P.A. (concentração final de HCl 1,2 M) para realização da hidrólise da amostra. O extrato foi homogeneizado em banho-maria a temperatura de 35°C, na ausência de luz por 24 horas e, após este período, a mistura foi filtrada em algodão e o sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador a 40°C por 20 minutos. O resíduo concentrado foi redissolvido em metanol até o volume final de 10 mL, o qual foi centrifugado (7.000 x g) por 10 minutos, sendo então injetada uma alíquota de 30 μ L no cromatógrafo líquido.

O cromatógrafo consiste no sistema HPLC-Shimadzu, com injetor automático, detector UV-visível a 280nm, coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (5 μ m, 4,6mm x 150mm) com fase estacionária octadecil e uma coluna de guarda CLC-GODS (4) com fase estacionária de superfície octadecil, ambas localizadas em forno a 25°C. A fase móvel consistiu no gradiente de eluição (Tabela 1) utilizando solução aquosa de ácido acético (99:1, v/v) e metanol, com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, com um tempo total de corrida de 45 minutos, segundo metodologia descrita por Zambiasi (1997).

Os compostos fenólicos individuais foram quantificados com base na curva de calibração dos padrões externos de ácido p-cumárico, ácido cafeico, quercetina, ácido ferúlico, epicatequina, ácido p-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido elágico, catequina, miricetina e campferol. Os valores dos pontos de calibração foram estipulados com base em estudos prévios de quantificação de compostos fenólicos individuais em pequenas frutas (SHAHRZAD et al., 1996), os resultados foram expressos em miligramas do composto fenólico por 100 gramas de fruta fresca.

Tabela 1. Programa do gradiente de eluição dos solventes para separação de compostos fenólicos individuais em amora-preta (*Rubus fruticosus*).

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	100	0
25	60	40
27	60	40
37	95	5
42	95	5
45	100	0

Solvente A: solução aquosa de ácido acético (99:1 v/v); Solvente B: metanol

Fonte: Chim, 2008.

B. Determinação de antocianinas individuais

Na extração de antocianinas individuais foi utilizado o método adaptado de Zhang et al. (2004), que consistiu na extração do pigmento com uma solução de metanol e ácido clorídrico (99,9:0,1v/v), seguida de uma agitação por três horas, filtração, concentração em rotaevaporador a 30°C por 20 minutos e dissolução em solução de metanol com 1% de HCl, até completar 5 mL em balão volumétrico. Após o extrato foi centrifugado (7.000 x g) por 10 minutos, sendo então injetada uma alíquota de 10 µL no cromatógrafo líquido.

O sistema cromatográfico utilizado consiste no sistema HPLC-Shimadzu (idem ao descrito na análise de compostos fenólicos individuais) com detector UV-visível a 520 nm. A fase móvel consistiu em um gradiente de eluição (Tabela 2) com solução aquosa de ácido acético (98:2,0% v/v), metanol e acetonitrila, com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ e tempo total de corrida de 40 minutos.

Os picos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões e quantificados através de curvas de calibração de padrão externo de cloreto de malvidina, cloreto de Kuromanina (cianidina-3-glicosídeo), cloreto de Keracianina (cianidina-3-rutinosídeo), cloreto de Pelargonidina, cloreto de Peonidina, cloreto de Delfinidina, cloreto de Cianidina e malvidina-3-galactosídeo. Os resultados foram expressos em miligramas do composto antocianico por 100 gramas de fruto *in natura*.

Tabela 2. Programa do gradiente de eluição dos solventes para separação de antocianinas individuais em amora-preta (*Rubus fruticosus*)

Tempo (minutos)	Fase móvel	Fase móvel (%)
0	A	100
	B	0
	C	0
10	A	90
	B	0
	C	10
15	A	80
	B	10
	C	10
20	A	80
	B	10
	C	10
25	A	80
	B	10
	C	10
30	A	70
	B	0
	C	30
35	A	70
	B	0
	C	30
40	A	100
	B	0
	C	0

Solvente A: solução aquosa de ácido acético (98:2, v/v); Solvente B: metanol; Solvente C: acetonitrila.

Fonte: Pertuzatti, 2009.

C. Determinação de ácido L-ascórbico

Para a extração do ácido L-ascórbico, a amostra foi dissolvida com ácido metafosfórico a 4,5% em água ultra pura ao abrigo da luz a temperatura ambiente, após filtrou-se e completou-se o volume para 50 mL em água ultra pura. Do filtrado retirou-se uma alíquota de 1,5 mL e centrifugou-se por 10 minutos a 9000 x g. O sobrenadante foi recolhido e uma alíquota de 20µL da amostra foi injetada em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Para a determinação de ácido L-ascórbico foi realizada análise em cromatografia líquida de alta eficiência constituída de sistema HPLC-Shimadzu (idem ao descrito na análise de compostos fenólicos), utilizando o detector UV-visível a 254 nm. Utiliza-se um sistema de eluição gradiente (Tabela 3) com as fases móveis contendo água ultra pura:ácido acético (99,9:0,1 v/v) e metanol (100%), com tempo total de corrida de 10 minutos e fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, seguindo a metodologia adaptada de Vinci, Rot e Mele (1995) e de Ayhan, Yeom e Zhang (2001).

Tabela 3. Programa de gradiente de eluição dos solventes na determinação de ácido L-ascórbico em amora-preta (*Rubus fruticosus*).

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	100	0
5	98	2
7	98	2
10	100	0

Solvente A: solução de água ultra pura: ácido acético (99,9:0,1 v/v); Solvente B: metanol.

Fonte: Chim, 2008.

Para a quantificação de vitamina C utilizou-se a curva quadrática de padrão externo, preparada com ácido L-ascórbico. O conteúdo de ácido L-ascórbico na amora-preta foi expresso em miligramas de ácido L-ascórbico por 100 gramas de fruta fresca.

D. Determinação de carotenóides individuais

O processo de extração para determinação e quantificação de carotenóides individuais foi realizado utilizando a mesma metodologia de extração de amostra para a determinação de carotenóides totais. Após a etapa de extração foi realizada a saponificação da amostra com KOH (1,5N). Logo a amostra foi centrifugada (9000 x g) por 10 minutos e injetada uma alíquota de 20 µL no cromatógrafo líquido.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência consistiu no sistema HPLC-Shimadzu (idem ao descrito para a análise de compostos fenólicos), equipado com detector UV, utilizando o comprimento de onda de 450 nm. Utilizou-se um sistema de eluição gradiente (Tabela 4) de metanol, acetonitrila e acetato de etila, com tempo total de corrida de 40 minutos um fluxo de 1 mL.min⁻¹.

Tabela 4. Programa do gradiente de eluição dos solventes para separação de carotenóides individuais em amora-preta (*Rubus fruticosus*)

Tempo (minutos)	Fase móvel	Fase móvel (%)
0	A	30
	B	70
	C	0
10	A	10
	B	80
	C	10
35	A	5
	B	80
	C	15
40	A	30
	B	70
	C	0

Solvente A: metanol; Solvente B: acetonitrila; Solvente C: acetato de etila

Fonte: Pertuzatti, 2009.

Os compostos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões e quantificados através de curvas de calibração do padrão

externo de β -criptoxantina, licopeno, luteína e β -caroteno. O conteúdo de carotenóides individuais na amora-preta foi expresso em miligramas de carotenóides individual por 100 gramas de fruta fresca, e foi determinada a soma dos carotenóides individuais (β -caroteno, luteína + zeaxantina, licopeno e β -criptoxantina).

F. Determinação de tocoferóis

Para a extração de tocoferóis, foi utilizada a metodologia para extração de carotenóides totais de Rodriguez-Amaya (1999), com algumas modificações. Após a extração da fase etérea, esta foi separada e centrifugada ($9000 \times g$) por 10 minutos e transferida a um vial de 1,5 mL para a injeção de uma alíquota no cromatógrafo.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência consistiu no sistema HPLC-Shimadzu (idem ao descrito para a análise de compostos fenólicos individuais), equipado com detector de fluorescência, utilizando o comprimento de onda de 290 nm para excitação e de 330 nm para a emissão. Utilizou-se um sistema de eluição gradiente (Tabela 5), com fases móveis: metanol, acetonitrila e isopropanol, seguindo a metodologia adaptada de Zambiasi (1997). O tempo total de corrida foi de 15 minutos e fluxo de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Tabela 5. Programa do gradiente de eluição dos solventes na separação de tocoferóis individuais em amora-preta (*Rubus fruticosus*)

Tempo (minutos)	Fase móvel	(%) Fase móvel
0	A	40
0	B	50
0	C	10
10	B	30
10	A	65
10	C	5
12	B	50
12	A	40
12	C	10
15	B	50
15	A	40
15	C	10

Solvente A: metanol; Solvente B: acetonitrila; Solvente C: isopropanol.

Fonte: Chim, 2008.

Para a quantificação de α -, δ - e γ - tocoferol utilizou-se uma curva de padrão externo, preparada com os padrões cromatográficos correspondentes. A quantificação de β - tocoferol foi realizada baseada na curva de calibração do γ - tocoferol, porque estes dois compostos não foram separados no processo cromatográfico, e, portanto, foram quantificados conjuntamente.

O conteúdo total de tocoferóis, expresso em miligrama de tocoferóis por 100 gramas de amostra, foi determinado pela soma dos tocoferóis individuais (α -, δ - e γ - tocoferol).

3.3.7. Determinação da atividade antioxidante

A. Atividade antioxidante *in vitro*

Em extratos metanólicos dos pontos de maturação dos frutos, macerados por 24 horas, foram determinadas as atividades antioxidantes segundo método adaptado de Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995), que se baseia na redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrylhidrazil (DPPH), com algumas modificações. Para a extração dos compostos com atividade antioxidante presentes nas amostras trituradas, utilizou-se metanol. Após maceração de 24h a uma temperatura de 3-4°C a amostra foi centrifugada (7000 x g) por 10 minutos.

Foi preparada uma solução mãe de DPPH pesando-se 24mg do radical livre DPPH e dissolvendo em 100 mL de metanol, após esta foi estocada sob refrigeração. No momento da análise, retirou-se 10 mL da solução mãe, que foram diluídos em 45 mL de metanol, para preparar a solução uso. A absorbância desta solução foi ajustada para $1,1 \pm 0,02$.

Para quantificação da atividade antioxidante, 100 μ L do extrato da amostra foram adicionados a 3,9 mL da solução uso de DPPH. A absorbância da amostra foi lida em espectrofotômetro (*Ultrospect® 2000 UV/Visível Pharmacia*) após 30 minutos a um comprimento de onda de 517 nm. O resultado foi expresso em percentual de inibição (%) e em mM TE (equivalente em Trolox) por 100 gramas de fruto fresco.

B. Atividade antioxidante *in vivo*

A atividade antioxidante *in vivo* foi determinada segundo metodologia descrita por Soares et al. (2005), utilizando células eucarióticas da levedura *Saccharomyces* XV 185-14C (MAT α , ade 01/02, 17/04 arg, seu 1-7, 1-1 lys, trp 1-1, 5-48 trp, hom 10/03), fornecido pelo Dr. Von Borstel RC (Departamento de Genética da Universidade de Alberta, Edmonton, AB, Canadá).

Uma porção desta cepa foi mantida em meio YPD sólido contendo extrato de levedura (1% w/v), glicose (2% w/v), peptona (2% w/v) e agar (2% w/v). As células foram transferidas para um meio líquido (mesma composição de meios sólidos sem ágar) e colocadas em um agitador orbital a 28°C e 160 rpm.

As suspensões celulares contendo 2×10^6 células de levedura.mL⁻¹, foram então tratadas com extratos diluídos (extrato:água) P1 (1:8), P2 (1:7), P3 (1:6), P4 (1:3) e P5 (1:3) e incubados por 1 hora a 28°C sob agitação no escuro, estas diluições foram estabelecidas em função da maior concentração não citotóxica determinada em ensaios preliminares. As células foram centrifugadas (2000 x *g*, 28°C por 5 minutos) e lavadas com 0,9% (w/v) de solução de cloreto de sódio (duas vezes). Finalmente as células foram destacadas com solução de água oxigenada 50 mM para uma hora a 28°C. As amostras foram diluídas em uma solução de cloreto de sódio (0,9% w/v), semeadas em meio de cultura completo YPD e incubadas a 28°C por 48 horas.

Após a incubação, as colônias foram contadas e fez-se referência das placas teste, ao número total de colônias observadas na placa de controle (células não tratadas) que esta última foi definida como a sobrevivência celular de 100%.

3.3.8. Atividade antimicrobiana

Foi utilizada a linhagem de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) que foi mantida a 5 °C em meio TSA. A atividade antimicrobiana dos extratos foi testada pelo método de difusão em disco de acordo com o *National Commitee for Clinical Laboratory Standards Guidelines* (NCCLS, 2001), com algumas modificações.

Foram utilizadas suspensões de células com 10^7 UFC/mL obtidas pelo padrão de turbidez *McFarland* N° 0.5, as quais foram padronizadas ajustando-se à densidade óptica de 0,100 a 625 nm. Uma suspensão do microrganismo foi

espalhada em Agar *Mueller-Hinton* em placas de Petri com diâmetro de 15 cm. Discos de papel filtro (6 mm de diâmetro) foram embebidos com 10 µL do extrato. Após os discos foram secos à temperatura ambiente (20 ± 3 °C) e colocados na superfície das placas inoculadas, que foram incubadas a 37°C por 24h. Os diâmetros das zonas de inibição foram mensuradas em milímetros. O antibiótico Ciprofloxacina foi utilizado como controle positivo, e água ultra pura como controle negativo, e as zonas de inibição foram comparadas com aquelas dos discos de referência.

A mínima concentração inibitória (MIC) foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento do microrganismo, detectado visualmente. Foram utilizadas as seguintes concentrações dos extratos: 100%, 66% e 33%, que equivalem a aproximadamente, 750 mg.mL^{-1} , 500 mg.mL^{-1} e 250 mg.mL^{-1} , respectivamente.

3.3.9. Análise estatística

Os dados foram analisados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilks e quanto a homocedasticidade pelo teste de Hartley. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Os efeitos de estádios de maturação foram avaliados por comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A comparação com a testemunha e/ou controle, nas variáveis atividade antimicrobiana e sobrevivência de leveduras, foi realizada pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). A presença de correlações entre as variáveis dependentes do estudo foi analisada através do coeficiente de correlação de Pearson (SAS Institute, 2002).

4. Resultados e discussão

Como ponto de partida para diferenciar os cinco estádios de maturação foi realizada a avaliação instrumental da cor (Tabela 6), sendo esta uma determinação muito útil para correlacionar com os pigmentos presentes nos frutos, bem como as mudanças ao decorrer do seu desenvolvimento.

Tabela 6. Coordenadas de cor e ângulo hue (H°) em amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009).

Estádios de Maturação	L	a	b	H°
P1	44,36 a ^{1/}	-14,17 d	32,19 a	113,76 a
P2	43,86 a	8,57 b	27,83 a	72,91 b
P3	21,25 b	23,39 a	11,28 b	24,92 c
P4	15,96 c	8,67 b	1,48 c	9,67 d
P5	14,75 c	2,58 c	0,19 c	4,25 d
Média Geral	28,03	5,81	14,60	45,10
CV (%)	5,9	34,5	15,2	7,2
DesvPad	14,87	13,55	14,79	46,95

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).
CV- coeficiente de variação.

De acordo com os resultados obtidos, em especial pelo ângulo hue (H°), pode-se observar que há uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os estádios P1, P2, P3 e agrupados P4 e P5, demonstrando ser esta avaliação interessante para

delimitar os estádios, porém ainda não totalmente, visto que dois grupos ainda permanecem sem diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre eles.

Tabela 7. Determinações físico-químicas em amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPeI, Pelotas-RS, 2008/2009).

Estádios de Maturação	Acidez titulável (mg ác. málico.100g ⁻¹)	Sólidos Solúveis (°Brix)	Índice de Maturação (SS/AT)
P1	17,43 ab ^{1/}	4,90 d	0,28 d
P2	18,35 a	5,10 d	0,28 d
P3	15,68 b	6,20 c	0,40 c
P4	12,78 c	7,00 b	0,55 b
P5	11,54 c	8,40 a	0,73 a
Média Geral	15,15	6,32	0,45
CV (%)	6,2	1,6	8,3
DesvPad	2,93	1,44	0,19

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).
CV- coeficiente de variação

Com relação às análises físico-químicas (Tabela 7), pode-se verificar que a acidez total titulável (AT) decresce, diferindo significativamente ($p \leq 0,05$), ao longo do desenvolvimento do fruto, com exceção de P4 e P5 que, assim como ocorreu no ângulo hue, não diferiram entre si, o que indica que somente estes dois testes ainda são insuficientes para diferenciar os cinco estádios. O teor de acidez natural é representado principalmente pela presença do ácido málico, que é o ácido orgânico majoritário em amora-preta (KAFKAS, 2006).

O contrário ocorre com os sólidos solúveis (SS) que aumentam significativamente ($p \leq 0,05$) à medida que o fruto torna-se mais maduro (Tabela 7). Com esta avaliação podemos diferenciar os pontos 4 e 5, porém, não diferimos mais os pontos 1 e 2, o que corrobora para o uso de mais de uma avaliação para se ter uma diferenciação dos estádios. Tais resultados estão de acordo com os descritos por Chim (2008) que verificou valores de sólidos solúveis de 8,5 °Brix, em amora-

preta madura da safra 2006/2007; e Mota (2006) relata valores de sólidos solúveis de 7 °Brix, em amora-preta oriundas da safra 2003/2004.

O índice de maturação (SS/AT) aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) durante o desenvolvimento do fruto (Tabela 7), porém nesta avaliação não diferimos os pontos 1 e 2, assim como nos resultados de sólidos solúveis totais. Vale ainda ressaltar que esta avaliação não está sendo utilizada com o intuito de avaliar o ponto de colheita, que seria sua função original, mas sim ser mais uma ferramenta na diferenciação dos cinco pontos de maturação aqui propostos. Resultados semelhantes obtiveram Acosta-Montoya et al. (2010) em seu trabalho, porém estes autores trabalharam somente com três estádios de maturação tardios e comestíveis de amoras-pretas (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) provenientes de clima tropical em terras altas, estes autores afirmam que o índice de maturação (SS/AT) apresenta-se como um bom indicador de maturidade do fruto, pois aumenta durante a maturação/desenvolvimento deste.

Essas três variáveis demonstradas na Tabela 7 apresentam forte correlação, segundo coeficiente de correlação de Person, dados demonstrados na tabela em anexo (Apêndice I), bem como acompanha nesta correlação o ângulo hue, o que indica que estas quatro avaliações são determinações eficientes para diferenciar os frutos em estádios de maturação/desenvolvimento.

Com relação aos compostos fitoquímicos presentes nos frutos, a partir de extratos obtidos dos cinco estádios de maturação, já delimitados previamente pelas determinações físico-químicas, pode-se afirmar que, de acordo com os resultados não houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) para os compostos fenólicos totais (Tabela 8), a catequina (Tabela 9) e o ácido L-ascórbico (Tabela 10).

Tabela 8. Fenóis totais em amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPeL, Pelotas-RS, 2008/2009).

Estádios de maturação	Fenóis totais (mg GAE.100g ⁻¹)
P1	5267,22 ^{ns}
P2	4217,59 ^{ns}
P3	2801,36 ^{ns}
P4	3114,34 ^{ns}
P5	4062,66 ^{ns}
Média Geral	3892,64
CV (%)	36,2
DesvPad	977,32

^{ns} valores não significativos ($p \leq 0,05$). CV- coeficiente de variação.

GAE= equivalente em ácido gálico.

Sobre a diferença não significativa ($p \leq 0,05$) nos resultados de compostos fenólicos totais (Tabela 8), esta pode estar relacionada, possivelmente, às condições edafoclimáticas que a planta é submetida, pois a síntese de fenóis está ligada aos fatores de metabolismo secundário de proteção da planta (MOYER et al., 2002), bem como, os cinco estádios de maturação apresentam resultados semelhantes devido a possíveis conversões químicas dos compostos fenólicos individuais no decorrer do desenvolvimento dos frutos.

Estes, ainda, apresentaram uma média de 3892,64 mg GAE.100 g⁻¹, o que é considerado um teor alto destes componentes. O alto conteúdo de fenóis totais pode ser explicado, pois sendo esta quantificação uma estimativa do conteúdo de todas as subclasses de compostos fenólicos presentes nas amostras, abrangendo flavonóides, antocianinas e compostos fenólicos não flavonóides (SELLAPPAN et al.; 2002).

Outro fator que pode contribuir para os valores elevados, e com a não diferença significativa ($p \leq 0,05$) destes nos frutos, é que os teores de fenóis totais são geralmente superestimados, por causa da inclusão de compostos não fenólicos, dentre os quais açúcares e ácido L-ascórbico, que podem interferir na reação com Folin-Ciocalteu (GEORGE et al., 2005).

No entanto, há relatos na literatura de altas concentrações de fenóis totais em amoras-pretas, sugerindo que esse fruto possui alto poder antioxidante (SELLAPPAN et al.; 2002). Mertz et al. (2007), encontraram teores de fenóis totais de 4250 mg GAE.100 g⁻¹ e 6300 mg GAE.100 g⁻¹, em base seca, em *R. adenotrichus*, provenientes da Costa Rica, e *R. glaucus*, provenientes do Equador, respectivamente. Chim (2008) encontrou valores de compostos fenólicos totais ao redor de 569,89 mg GAE.100 g⁻¹ para a mesma cultivar, também em Pelotas-RS, na safra 2005/2006, onde as condições edafoclimáticas podem ser diferentes, visto que o pomar não é o mesmo, apesar de estar na mesma região.

Para os teores de compostos fenólicos individuais (Tabela 9) foram determinados alguns ácidos fenólicos, como os derivados do ácido benzóico, dentre os quais o ácido p-hidroxibenzóico, o ácido gálico e o seu dímero de condensação: o ácido elágico; os derivados do ácido cinâmico, representados pelo ácido cafeico, ácido p-cumárico e pelo ácido ferúlico e flavanols: epicatequina e catequina.

Tabela 9. Compostos fenólicos individuais (Ácido gálico, Ácido p-hidroxibenzóico, Ácido elágico, Ácido cafeico, Catequina, Epicatequina, Ácido p-cumárico, Ácido ferúlico e somatório) em amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009).

Estádios de maturação	Ácido gálico (mg.100g ⁻¹)	Ácido p-hidroxibenzóico (mg.100g ⁻¹)	Ácido elágico (mg.100g ⁻¹)	Ácido cafeico (mg.100g ⁻¹)
P1	8,40 c ^{1/}	10,80 d	1,06 c	8,20 a
P2	17,78 c	11,73 d	9,21 b	5,73 ab
P3	55,22 c	33,69 c	5,74 b	3,86 bc
P4	128,15 b	74,55 b	5,78 b	2,39 c
P5	199,04 a	146,33 a	15,65 a	1,77 c
Média	81,72	55,42	7,49	4,39
CV (%)	22,5	8,0	19,6	22,7
DesvPad	80,75	57,01	5,40	2.61

Estádios de maturação	Catequina (mg.100g ⁻¹)	Epicatequina (mg.100g ⁻¹)	Ácido p-cumárico (mg.100g ⁻¹)	Ácido ferúlico (mg.100g ⁻¹)	Σ (mg.100g ⁻¹)
P1	6,36 ^{ns}	64,32 c	2,10 ab	3,56 a	104,79 c
P2	4,61 ^{ns}	49,77 c	2,88 a	2,77 a	104,48 c
P3	3,58 ^{ns}	53,36 c	1,39 ab	1,62 b	158,46 c
P4	3,57 ^{ns}	172,54 b	0,87 b	1,36 b	389,23 b
P5	1,94 ^{ns}	444,94 a	0,49 b	1,05 b	811,21 a
Média	4,35	156,98	1,54	2,07	313,63
CV (%)	49,2	7,8	27,2	15,2	7,7
DesvPad	1,62	168,80	0,95	1,05	301,96

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). ^{ns} Diferença não significativa (p≤0,05). CV- coeficiente de variação.

No decorrer do desenvolvimento do fruto é possível visualizar que os derivados do ácido benzóico e um flavanol, a epicatequina, aumentaram significativamente (p≤0,05) seus teores, o que não ocorreu com a catequina, uma vez que seus teores permaneceram praticamente inalterados, o que explica a não significância (p≤0,05) destes resultados. Os derivados do ácido cinâmico, neste fruto, apresentaram um comportamento diferenciado, uma vez que durante o desenvolvimento destes há uma queda significativa (p≤0,05) de seus teores.

Todos os compostos fenólicos individuais possuem forte correlação (Apêndice I) com as determinações físico-químicas e com o ângulo hue, o que indica que estão de acordo com a diferenciação dos pontos de maturação propostos. Afora isso, todos os compostos fenólicos individuais se correlacionam entre si, com exceção do ácido p-cumárico que não apresentou correlação com ácido elágico e com a catequina.

Com relação aos maiores teores no ponto de maturação cinco, ponto de consumo deste fruto, tem-se destaque para epicatequina, ácido gálico e ácido p-hidrobenczóico, com $444,94 \text{ mg.100g}^{-1}$, $199,04 \text{ mg.100g}^{-1}$ e $146,33 \text{ mg.100g}^{-1}$, respectivamente, que juntos perfazem mais de 97% dos compostos fenólicos individuais, representando um notável aumento destes compostos durante o transcorrer da maturação dos frutos, uma vez que no ponto de maturação um, estes três compostos perfaziam 79,7% do total do somatório dos compostos fenólicos individuais, onde tinha-se epicatequina com $64,32 \text{ mg.100g}^{-1}$, ácido gálico com $8,40 \text{ mg.100g}^{-1}$ e ácido p-hidroxibenzzóico com $10,80 \text{ mg.100g}^{-1}$, com atenção maior para o ácido gálico que aumentou em média 95,78%.

Chim (2008) em amoras-pretas cv. Tupy safra 2005/2006 cultivadas na mesma região, detectou como composto fenólico majoritário o ácido gálico, apresentando $151,44 \text{ mg.100g}^{-1}$, tal valor é próximo do encontrado neste estudo, porém o perfil de compostos fenólicos individuais foi um pouco diferenciado, uma vez que neste estudo o destaque como fenólico individual foi para o teor de epicatequina, para amora-preta madura. Este fato pode ter ocorrido devido a alterações nas rotas metabólicas do ácido chiquímico. Onde ao invés da produção do ácido gálico, houve uma maior conversão dos compostos oriundos da rota do ácido cítrico em fenilalanina e conseqüentemente a conversão em ácido cinâmico e, com a adição de elementos da rota do ácido mevalônico, a metabolização dos flavonóides em especial a epicatequina.

Sellappan et al. (2002) analisando amostras de amora-preta 'Choctaw' e 'Kiova' maduras, detectaram como ácidos majoritários o gálico e o cafeico, com $6,42$ e $4,12 \text{ mg.100g}^{-1}$ e $1,38$ e $3,64 \text{ mg.100g}^{-1}$, respectivamente. Siriworarn et al. (2004) em seu trabalho com amoras-pretas 'Marion' e 'Evergreen', cultivadas em clima temperado, em três diferentes estádios de maturação, a saber: sob maduro, maduro e sobre maduro, reportaram a presença de elagínatos (expresso em ácido elágico) majoritariamente, porém este decresceu significativamente ($p \leq 0,05$) ao longo da

maturação em ambas cultivares (34,8 a 32,3 mg.100g⁻¹ e 34,6 a 17,6 mg.100g⁻¹, respectivamente), e, ainda, de derivados do ácido elágico, que aumentaram ao longo da maturação, significativamente para 'Marion', porém não houve diferença significativa para 'Evergreen' (0,96 a 1,39 mg.100g⁻¹ e 2,17 a 2,61 mg.100g⁻¹ respectivamente) e catequina que aumentou em 'Marion' e decresceu em 'Evergreen' (0,6 a 13,8 mg.100g⁻¹), porém não foi detectada no estágio maduro (38,9 a 19,5 mg.100g⁻¹), respectivamente. Acosta-Montoya et al. (2010) no seu estudo de três pontos de maturação comestíveis de amora-preta (*Rubus adenotrichus*), cultivadas em clima tropical, quantificaram elagínatos (expressos em equivalentes ao ácido elágico), onde houve um decréscimo destes no decorrer da maturação de 378,4 mg.100g⁻¹ para 217,5 mg.100g⁻¹. As diferenças entre os estudos podem ser devido às diferenças entre cultivares, regiões de cultivo, condições de pré-colheita que influenciam na biossíntese de fitoquímicos, ou ainda, às diferenças metodológicas de extração dos compostos.

Muitos trabalhos relatam a presença de quercetina em amora-preta (ACOSTA-MONTOYA et al., 2010; VASCO et al. 2009; MERTZ et al., 2007; SIRIWOHARN et al., 2005; MÄÄTTÄ-RIIHINEN et al., 2004), porém neste estudo este composto não foi detectado, assim como no trabalho de Sellappan et al. (2002) que não detectaram quercetina em duas variedades de amoras-pretas. Chim (2008) analisando a mesma cultivar também não detectou a presença de quercetina, mesmo sendo ambos frutos colhidos em safras diferentes, porém na mesma região, o que pode significar que nesta região geográfica e para esta cultivar, as condições edafoclimáticas não priorizam a formação deste composto.

Os teores de ácido L-ascórbico presentes na Tabela 10, não diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) nos cinco estádios de maturação do fruto.

Tabela 10. Determinações de ácido L-ascórbico em amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009).

Estádios de maturação	Ácido L-ascórbico (mg ác. L-ascórbico.100g ⁻¹)
P1	6,67 ^{ns}
P2	8,29 ^{ns}
P3	4,99 ^{ns}
P4	4,27 ^{ns}
P5	3,58 ^{ns}
Média Geral	5,57
CV (%)	47,7
DesvPad	1,91

^{ns} valores não significativos ($p \leq 0,05$). CV- coeficiente de variação.

Tais resultados perfazem uma média de 5,57 mg.100 g⁻¹ de fruto fresco, resultado este inferior ao citado por outros autores. Pantelidis et al. (2007) encontraram uma média de 14 mg.100 g⁻¹ de ácido L-ascórbico em fruto fresco, em seu estudo com quatro variedades de amora-preta madura, e Lee & Kader (2000), citando Agar et al. (1997), relatam teores de 18 mg.100 g⁻¹. Estes autores relatam que tais diferenças podem ser explicadas por diferentes condições climáticas, práticas culturais e, ainda, o ponto de maturação do fruto no momento da colheita.

Mas quando comparados a resultados de amora-preta madura cultivada em clima temperado na região de Pelotas, os valores do atual estudo (P5 = 3,57 mg.100 g⁻¹) são superiores aos encontrados por Chim (2008), 2,49 mg.100g⁻¹ cv. Tupy, 0,73 mg.100g⁻¹ cv. Guarani e 0,70 mg.100g⁻¹ cv. Brazos, para o ácido L-ascórbico.

Atala et al. (2009) relatam conteúdos de 6 mg.100g⁻¹ para a amora-preta e de 8 mg.100g⁻¹ para a mirtilo. Os resultados indicam que na cultivar analisada de amora-preta, o conteúdo de vitamina C é pouco expressivo e que apesar de este fruto ser considerado rico em compostos antioxidantes, o teor de vitamina C não é representativo quando comparado com fitoquímicos como compostos fenólicos.

No que tange aos valores de antocianinas totais presentes na Tabela 11, outro composto fenólico relevante neste fruto, os estádios apresentaram crescente diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Tabela 11. Antocianinas totais (mg Cy-3-glc equivalente.100g⁻¹) em amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009).

Estádios de maturação	Antocianinas totais (mg Cy-3-glc equivalente.100g ⁻¹)
P1	2,31 d
P2	2,17 e
P3	6,62 c
P4	26,68 b
P5	35,71 a
Média Geral	14,70
CV (%)	0,29
DesvPad	15,49

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

CV- coeficiente de variação.

Cy-3-glc equivalente = equivalente a cyanidina-3-glicosídeo.

Resultados estes que concordam com a progressão da maturação do fruto, pois apresenta fortíssima correlação (Apêndice I) com as determinações físico-químicas que delimitam os cinco estádios de maturação (sólidos solúveis, acidez total e índice de maturação), além de correlacionar, também, com o ângulo hue (H°). Isto demonstra que durante a maturação a biossíntese de antocianinas nos tecidos vegetais é aumentada, resultando em uma maior concentração destes pigmentos, por modificação no padrão das antocianinas ou por alteração do pH, juntamente com uma mudança na aparência dos frutos (STINTZING & CARLE, 2004).

Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente de raios ultravioleta, pois a formação dos flavonóides é acelerada pela luz. Consequentemente, em plantas cultivadas em estufas, onde os raios ultravioleta são bloqueados, o conteúdo de flavonóides é reduzido; assim como os vegetais que crescem na Espanha ou na África do Sul são apontados como contendo de 4 a 5 vezes mais flavonóides que os que crescem no Reino Unido (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKY, 2004).

Tal relato pode explicar o fato de a amora-madura deste estudo (P5) ter teores inferiores deste composto (35,72 mg.100g⁻¹), pois Chim (2008) apresentou para a mesma cultivar de amora 137,59 mg.100g⁻¹, visto que neste período de

colheita dos frutos da safra 2008/2009, a incidência de luminosidade foi inferior a média registrada neste período, bem como a nebulosidade foi superior. E afora isto, não se tem certeza se ambas as coletas obedeceram ao mesmo grau de maturação, dito maduro.

Outro fator preponderante para o aumento no teor de antocianinas é a amplitude térmica do período, e segundo dados climatológicos desta época, a amplitude térmica neste período foi de 8,9°C não sendo suficiente para um maior acúmulo deste fitoquímico, uma vez que é necessária uma amplitude térmica superior a 10°C para haver maiores concentrações de antocianinas nos frutos.

Ademais, diferenças observadas quanto ao conteúdo de antocianinas totais pode estar relacionada com as variações genéticas, condições ambientais durante a colheita e também devido à ação enzimática na pós-colheita, principalmente devido a processos oxidativos das polifenoloxidasas, cujo principal substrato é a cianidina-3-glicosídeo, além do pH, que modifica a cor destas dependendo do meio que se encontram (LIMA e GUERRA, 2003, TERCI e ROSSI, 2002).

Das antocianinas individuais presentes em amoras-pretas o destaque é a cianidina-3-glicosídeo (VASCO et al. 2009; MERTZ et al., 2007; SIRIWOHARN et al., 2005; MÄÄTTÄ-RIIHINEN et al., 2004), o que é verificado com os resultados obtidos nos cinco diferentes estádios de maturação nos frutos deste estudo como podemos observar na Tabela 12.

Tabela 12. Antocianinas individuais (Cianidina-3-glicosídeo + Cianidina-3-rutinosídeo, Peonidina, Delfinidina e somatório das antocianinas individuais) em amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009).

Estádios de maturação	Cyanidina (mg.100g ⁻¹)	Peonidina (mg.100g ⁻¹)	Delfinidina (mg.100g ⁻¹)	Σ (mg.100g ⁻¹)
P1	0,06 d ^{1/}	0,032 b	0,000 c	0,092 d
P2	0,23 d	0,020 c	0,013 c	0,263 d
P3	1,13 c	0,021 c	0,159 b	1,310 c
P4	8,07 b	0,036 b	0,568 a	8,674 b
P5	35,32 a	0,103 a	0,589 a	36,01 a
Média Geral	8,96	0,042	0,265	9,27
CV (%)	1,0	7,6	3,5	1,0
DesvPad	15,10	0,03	0,29	15,36

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).
CV- coeficiente de variação.

A cianidina-3-glicosídeo apresenta teores de P1 a P5, de 0,06 mg.100g⁻¹ a 35,32 mg.100g⁻¹, respectivamente, apresentando diferença significativa (p≤0,05) entre os estádios de maturação. Resultado que corrobora com as avaliações de Acosta-Montoya et al. (2010), onde também percebeu-se um aumento significativo (p≤0,05) em seus três estádios de maturação comestíveis para *R. adenotrichus*. Vale ressaltar que no presente trabalho, a cianidina-3-rutinosídeo foi quantificada em conjunto com a cianidina-3-glicosídeo, por dificuldade da separação dos picos, mas foi possível visualizar nos cromatogramas o maior teor deste último, que se sobrepõe.

Tal perfil também é acompanhado pela peonidina e pela delfinidina, que aumentaram significativamente (p≤0,05) no decorrer da maturação, atingindo 0,103 mg.100g⁻¹ e 0,589 mg.100g⁻¹, respectivamente.

Estes resultados apresentam forte correlação (Apêndice I) com as determinações físico-químicas e com o teor de antocianinas totais, o que reporta ser um fator interessante na diferenciação da progressão da maturação. Além desses, a cianidina-3-glicosídeo e a delfinidina, também, apresentaram forte correlação com o ângulo hue.

Na literatura, ainda há relatos de presença de perlagonidina, que neste estudo não foi detectado (VASCO et al., 2009).

Os carotenóides totais com resultados descritos na Tabela 13 apresentaram um decréscimo significativo ($p \leq 0,05$) no seu conteúdo, no decorrer da maturação.

Tabela 13. Carotenóides totais em amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009).

Estádios de maturação	Carotenóides totais (mg β -caroteno equivalente.100g ⁻¹)
P1	1,78 a ^{1/}
P2	0,33 b
P3	0,06 c
P4	0,05 cd
P5	0,04 d
Média Geral	0,45
CV (%)	1,0
DesvPad	0,75

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).
CV- coeficiente de variação.

Os resultados apresentam-se passando de 1,78 para 0,04mg.100g⁻¹, de P1 até P5, respectivamente. O teor de carotenóides dos vegetais pode ser afetado por uma série de fatores como: o grau de maturação, o tipo de solo e as condições de cultivo, as condições climáticas, a variedade dos vegetais, a parte da planta consumida, o efeito dos agrotóxicos, a exposição à luz solar, as condições de processamento e estocagem (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Comparando os dados dos conteúdos de antocianinas e carotenóides, que neste presente trabalho apresentaram uma correlação média, é sugerido que o alto valor de antocianinas nestes frutos possa levar a cor dos carotenóides a estar sendo mascarada pelas antocianinas (MARINOVA & RIBANOVA, 2007).

Os resultados de carotenóides individuais estão apresentados na Tabela 14, estes apresentaram diferentes comportamentos ao decorrer da maturação, porém seu somatório apresenta um decréscimo significativo ($p \leq 0,05$).

Tabela 14. Carotenóides individuais (luteína+zeaxantina, licopeno, β -caroteno e somatório dos carotenóides individuais) em amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009).

Estádios de maturação	Luteína+zeaxantina (mg.100g ⁻¹)	Licopeno (mg.100g ⁻¹)	β -caroteno (mg.100g ⁻¹)	Σ (mg.100g ⁻¹)
P1	0,086 a ^{1/}	0,000 b	0,082 a	0,168 a
P2	0,029 b	0,001 ab	0,039 b	0,069 b
P3	0,003 c	0,000 b	0,001 c	0,004 c
P4	0,004 c	0,001 ab	0,000 c	0,005 c
P5	0,002 c	0,003 a	0,000 c	0,005 c
Média Geral	0,025	0,001	0,025	0,05
CV (%)	24	20	17,8	20,6
DesvPad	0,03	0,001	0,03	0,07

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).
CV- coeficiente de variação.

Nas determinações individuais de carotenóides houve um destaque para a luteína, que foi quantificada juntamente com a zeaxantina, por dificuldades na separação cromatográfica dos isômeros geométricos de carotenóides apolares, os quais não apresentaram boa resolução em colunas monoméricas C₁₈, concordando com citações da literatura que enfatizam a necessidade de colunas C₃₀ (poliméricas) para que haja separação destes compostos (LEE & CHEN, 2001). A luteína esteve presente em todos os estádios de maturação, mesmo que em decréscimo significativo ($p \leq 0,05$), onde passou de 0,086 mg.100g⁻¹ para 0,002 mg.100g⁻¹ no estágio mais maduro.

O β -caroteno teve o mesmo comportamento, porém só foi quantificado nos três primeiros estádios de maturação.

E o licopeno aparece em traços, salteado em alguns pontos, porém representando 0,003 mg.100g⁻¹ no ponto de maturação cinco, estando em maior concentração que a luteína+zeaxantina neste mesmo estágio.

Estes compostos fazem forte correlação (Apêndice I) com as determinações físico-químicas e com o ângulo hue, demonstrando, também, estarem sendo parâmetros que se modificam ao decorrer do desenvolvimento do fruto, também se

correlacionam fortemente com os carotenóides totais. A luteína+zeaxantina e o β -caroteno, possuem fortíssima correlação com os ácidos cafeico e ferúlico, derivados do ácido cinâmico, provavelmente por estes quatro compostos diminuírem ao longo da maturação.

Marinova & Ribanova (2007), em seus estudos corroboram com os resultados aqui expostos, uma vez que em estudo prévio a luteína se destaca como o principal carotenóide presente em *berries* da Bulgária, dentre as quais está presente a amora-preta, sendo seguida por β -caroteno e zeaxantina.

Os teores de tocoferol apresentados na Tabela 15 apresentam um comportamento diferenciado dos outros componentes fitoquímicos descritos neste estudo.

Tabela 15. Tocoferóis (alfa, delta, gama+beta e total) em amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009).

Estádios de maturação	α -tocoferol (mg.100g ⁻¹)	δ -tocoferol (mg.100g ⁻¹)	γ + β -tocoferol (mg.100g ⁻¹)	Σ (mg.100g ⁻¹)
P1	0,705 a ^{1/}	1,022 a	2,663 a	4,390 a
P2	0,682 a	0,629 b	1,842 a	3,153 a
P3	0,098 b	0,074 c	0,107 b	0,279 b
P4	0,472 ab	0,240 c	0,433 b	1,145 b
P5	0,527 ab	0,135 c	0,169 b	0,831 b
Média Geral	0,497	0,420	1,043	1,960
CV (%)	32,5	28,3	30,1	34,5
DesvPad	0,24	0,39	1,14	1,73

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p $\leq$ 0,05).
CV- coeficiente de variação.

Segundo os resultados é possível visualizar que, α -, δ - e (γ + β)-tocoferol, bem como seu somatório, decrescem nos três primeiros estádios de maturação, voltam a subir no ponto de maturação quatro e cinco para α -tocoferol e voltam a cair no ponto cinco para δ - e (γ + β)-tocoferol, refletindo o mesmo comportamento no somatório destes. Nas condições realizadas deste estudo (coluna de fase reversa C₁₈) o β -tocoferol não se separou de seu isômero, o γ -tocoferol, e, portanto, estão sendo quantificados em conjunto, correspondendo ao conteúdo do (γ + β)-tocoferol.

Para α -tocoferol, o tocoferol que mais se destacou no último estágio de maturação deste estudo, houve decréscimo significativo ($p \leq 0,05$) de 0,705 a 0,527 mg.100g⁻¹ no decorrer da maturação. Este resultado assemelha-se a dados reportados deste componente, considerado precursor da vitamina E, em outro trabalho com mirtilo maduro, que apresentou 0,53 mg.100g⁻¹ (CHUN et al., 2006).

Neste estudo foram encontrados teores de tocoferóis totais em decréscimo significativo ($p \leq 0,05$), partindo de 4,390 mg.100g⁻¹ até atingir 0,831 mg.100g⁻¹ no ponto mais maduro, resultados estes inferiores aos encontrados em amora-preta madura cultivada nos Estados Unidos que apresenta 3,740 mg.100g⁻¹, porém se equivale a outros frutos cultivados na mesma região, como o figo (0,760 mg.100g⁻¹), a nectarina (0,730 mg.100g⁻¹) e o pêssego (0,760 mg.100g⁻¹) (CHUN et al., 2006) e a tomates (0,890 mg.100g⁻¹) (LEE et al., 2000). Mas quando comparados com resultados apresentados por Chim (2008), para a mesma cultivar Tupy, de 0,168 mg.100g⁻¹, percebe-se que os teores apresentados neste estudo para o ponto de maturação cinco são superiores.

Os resultados obtidos tiveram forte correlação (Apêndice I) com os parâmetros físico-químicos e com o ângulo hue, o que demonstra estar em variação no decorrer do desenvolvimento do fruto, além de apresentar forte correlação entre os componentes individuais (α -, δ - e γ + β - tocoferol), também apresenta correlação com componentes fenólicos derivados do ácido cinâmico (ácido cafeico e ácido ferúlico) e com carotenóides totais, bem como, com β -caroteno e luteína, isso, provavelmente, por estarem todos decrescendo no decorrer da maturação.

Na literatura há poucos relatos de tocoferóis em amora-preta, por estes frutos serem considerados pobres neste componente e diferenças nos resultados podem ser explicadas por diferentes variedades e condições de crescimento do fruto, variando a incidência e duração da exposição à luz, propriedades químicas e físicas do solo, temperatura, incidência de precipitações, localização geográfica, que podem alterar o perfil de vitaminas presentes em frutos (CHING & MUHAMED, 2001).

A capacidade antioxidante *in vitro* dos cinco pontos de maturação foi expressa de duas maneiras, tanto em percentual de inibição, quanto em mM equivalente em Trolox por 100 gramas de peso fresco de fruto (Tabela 16).

Tabela 16. Capacidade antioxidante em percentual de inibição e em equivalente de Trolox - TEAC ($\text{mM} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de amostra) após 30 minutos de reação em amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009).

Estádios de maturação	DPPH (% inibição)	TEAC-relativa ($\text{mM TE} \cdot 100\text{g}^{-1}$)
P1	75,26 c ^{1/}	488,58 c
P2	88,56 b	563,12 b
P3	44,07 e	281,87 e
P4	63,52 d	399,09 d
P5	91,73 a	594,40 a
Média Geral	72,63	465,41
CV (%)	0,19	0,19
DesvPad	19,52	127,28

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

CV- coeficiente de variação.

DPPH- 1,1-difenil-2-picrihidrazila; TEAC- capacidade antioxidante equivalente a Trolox relativa; TE- equivalente a Trolox.

Os resultados, em ambas expressões apresentam o mesmo comportamento, onde há um aumento da capacidade antioxidante do ponto um para o ponto dois de maturação, logo, uma queda no ponto três e, a partir deste, um aumento até o ponto cinco, demonstrando um aumento significativo ($p \leq 0,05$) no decorrer do desenvolvimento do fruto, pois no início tem-se 75,26% (488,58 $\text{mM TE} \cdot 100\text{g}^{-1}$) até atingir no final 91,73% (594,40 $\text{mM TE} \cdot 100\text{g}^{-1}$) de inibição do radical DPPH, sendo, este último, superior ao encontrado por Kuskoski et al. (2005) que foi de 118,9 $\text{mM TE} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de fruta madura. Chim (2008) encontrou em seu estudo com amora-preta madura cv. Tupy o equivalente a 87,73% de inibição do radical DPPH, resultado inferior ao aqui exposto.

Os resultados da capacidade antioxidante se correlacionam com várias determinações do mesmo, dentre as quais estão o ácido elágico, a cianidina-3-glicosídeo, a peonidina e principalmente, mesmo em pequena concentração, o α -tocoferol (Apêndice I). Com base nestes dados, pode-se observar que o ponto de maturação três demonstrou comportamento semelhante para as análises de compostos fenólicos totais, ácido elágico, peonidina, α -tocoferol e capacidade

antioxidante *in vitro* (DPPH), onde este foi o ponto com os menores valores comparando-se aos demais pontos de maturação delimitados neste estudo. Pode-se inferir que este fato aconteça devido ser neste período de desenvolvimento do fruto que ocorra a rápida progressão da expansão celular, para o crescimento do mesmo, onde há acúmulo de água e outros solutos e os compostos secundários ficam mais diluídos, por conseguinte, nas avaliações seus teores podem aparecer minimizados.

Em posse destas informações, é observado que a capacidade antioxidante não é determinada apenas por um composto, mas sim pela sinergia de vários compostos presentes no fruto.

Segundo Duarte-Almeida et al. (2006), o ácido gálico e o ácido elágico seriam, dentre os ácidos fenólicos presentes na amora-preta, considerados como os principais responsáveis pela atividade antioxidante, apresentando 41% e 34% de inibição dos radicais livres, respectivamente. Porém, alguns autores encontram forte correlação entre o teor de antocianinas e a atividade antioxidante em variedades de uva (ABE et al., 2007; MUÑOZ-ESPADA et al., 2004) e em frutos de coloração avermelhada (KALLITHRAKA et al., 2005).

A capacidade antioxidante *in vivo* dos extratos obtidos dos cinco pontos de maturação, apresentadas na Tabela 17, também foi avaliada comparando-se os níveis de sobrevivência da levedura *S. cerevisiae* tratada com peróxido de hidrogênio (controle) e com os extratos de amoras e o agente estressor.

Tabela 17. Sobrevivência de leveduras (%) em presença de extratos de amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009).

Tratamentos	Sobrevivência de leveduras (%)	
Controle positivo (Água)	98,00	
Controle negativo (H ₂ O ₂ 50mM)	42,67	
P1 (1:8)	49,00*	c ^{1/} 49,00 ^{ns}
P2 (1:7)	49,33*	bc 49,33 ^{ns}
P3 (1:6)	57,67*	ab 57,67 *
P4 (1:3)	62,33*	a 62,33 *
P5 (1:3)	64,00*	a 64,00 *
Média Geral	56,46	
CV (%)	5,0	
DesvPad	7,05	

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), comparando os estádios de maturação. ^{ns} e * não significativo e significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) em função do controle positivo e negativo. CV- coeficiente de variação.

De acordo com os resultados obtidos observou-se diferença significativa crescente ($p \leq 0,05$) entre os pontos de maturação, durante o desenvolvimento do fruto na proteção desta levedura frente ao agente estressor, onde houve uma variação de 49% até 64% no fruto mais maduro. Demonstra-se assim, que os extratos obtidos dos diferentes pontos de maturação de amora-preta aumentam os índices de sobrevivência das leveduras, possuindo um potencial de proteção das células frente ao agente estressor.

Nos pontos de maturação P1 e P2 não foi diagnosticada diferença significativa, segundo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$), com a sobrevivência de leveduras do controle negativo, tratado somente com o agente estressor (H₂O₂ 50mM), isto indica que estes dois estádios, não possuem atividade antioxidante suficiente para proteger as células de *Saccharomyces*, frente ao agente estressor aqui utilizado. Tal fato pode ter ocorrido por dois motivos, primeiro, estes extratos foram diluídos em demasia, visto que em P1 tivemos uma diluição de 1:8 e em P2 1:7 em água, e outro fator, pode ser a composição dos fitoquímicos presentes, não estarem agindo como antioxidantes adequados.

Este resultado, porém, não possui correlação com a capacidade antioxidante *in vitro* medida através da reação de seqüestro do radical DPPH (Apêndice I). Deve

ser salientado, no contexto, que a determinação da capacidade antioxidante de uma amostra depende de vários fatores, como por exemplo, do tipo de teste utilizado, do agente estressor escolhido e das condições de solubilidade do meio. Ademais, alguns testes que avaliam a capacidade antioxidante *in vitro* não representam o que realmente acontece nas condições *in vivo*. O uso de eucariotos tem provado ser um meio eficaz, rápido, sensível e reprodutivo, na obtenção de bons resultados ao avaliar a capacidade antioxidante em sistemas biológicos (SOARES et al., 2005).

Haenen et al. (2005) relatam, no entanto, o efeito biológico de qualquer composto *in vivo* ou *in vitro* depende da estrutura do composto e da concentração do composto. Na estrutura geral, antioxidante e concentração são mais bem definidos e controlados durante estudos *in vitro* em comparação com estudos *in vivo*.

Soares et al. (2005) em seu trabalho do potencial de sobrevivência de levedura *S. cerevisiae* utilizando diferentes compostos fenólicos individuais, ácido L-ascórbico e vitamina E como protetores contra danos causados pelo agente estressor apomorfina, verificou que o ácido L-ascórbico teria pouca ação protetora (34%), a vitamina E teria média ação protetora (50%) e os compostos fenólicos individuais teriam a maior ação protetora (56 – 82%) indicando um importante efeito antioxidante. Resultados estes que se assemelham aos aqui expostos em especial quando verificamos as correlações desta avaliação com as demais verificações, onde, os níveis de sobrevivência de leveduras possuem forte correlação com a maioria das determinações realizadas, como as físico-químicas, o ângulo hue, o ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico, catequina, epicatequina, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, antocianinas totais, todas as antocianinas individuais detectadas neste estudo, ácido L-ascórbico, carotenóides totais, todos os carotenóides individuais deste estudo, aos tocoferóis totais e com α - e γ - β - tocoferol. Comprovando, mais uma vez, com este teste, que a capacidade antioxidante está na sinergia de diferentes compostos presentes no fruto.

A atividade antimicrobiana dos extratos de amora-preta provenientes de cinco diferentes estádios de maturação, apresentada na Tabela 18, foi testada frente a bactéria *Salmonella* Enteritidis de acordo com a presença ou ausência de halos de inibição nas diferentes concentrações pelo valor de MIC (Concentração Mínima Inibitória).

Tabela 18. Inibição da bactéria *Salmonella* em presença de extratos de amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy provenientes de cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009).

Estádios de maturação	Halo de inibição (mm)	Testemunha (mm) ^{1/}
P1 (33%)	7,00 b ^{2/} *	21,00
P2 (33%)	8,00 ab*	21,00
P3 (66%)	8,67 a*	21,00
P4 (66%)	8,33 a*	19,00
P5 (66%)	7,67 ab*	20,00
Média Geral	7,93	20,4
CV (%)	5,6	2,2
DesvPad	0,64	0,89

^{1/} A testemunha se refere ao controle positivo, sendo utilizado o princípio ativo Ciprofloxacina 5 µg.

^{2/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). * significativo, pelo teste de Dunnett (p≤0,05) em função da testemunha.

CV- coeficiente de variação.

MIC (concentração mínima inibitória) dos extratos: 100% = 750 mg.mL⁻¹; 66% = 500 mg.mL⁻¹; 33% = 250 mg.mL⁻¹.

Neste contexto, todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana, porém com diferentes respostas no que diz respeito às concentrações. O destaque é para o extrato P2 que apresentou maior inibição com um menor MIC (33%).

Os resultados demonstram que a bactéria *Salmonella enteritidis* foi sensível aos extratos, e segundo correlação apresentada com a capacidade antioxidante *in vitro*, tanto na % inibição do radical DPPH, quanto pela TEAC relativa (Anexo I), indica que esta atividade antimicrobiana está diretamente relacionada com a atividade antioxidante *in vitro* que estes extratos apresentam. Martini et al. (2009) relata em seu trabalho a relação entre a atividade antimicrobiana e a capacidade antioxidante que foi encontrada apenas para a cepa G21 CagA- de *H. Pylori*, e ainda ressalta que nesta atividade antioxidante teria destaque a participação do ácido elágico.

Três dos extratos (P3, P4 e P5) apresentaram valores de MIC de 66%, que contém aproximadamente uma concentração de 500 mg.mL⁻¹ de compostos extraídos na polaridade do metanol, os outros dois (P1 e P2) apresentaram valores de MIC em uma menor concentração 33%, que equivale a aproximadamente 250 mg.mL⁻¹. Segundo Panizzi et al. (2002), na extração de fitoquímicos de amora-preta na polaridade do metanol estariam presentes compostos como: flavonóides, ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferúlico, campeferol, quercetina, ácido clorogênico, dentre outros, ou seja, um perfil muito semelhante aos compostos exibidos pela

amora-preta neste estudo. Estes autores ainda apresentam resultados que seu extrato metanólico apresentaria forte inibição das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, e também da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e ainda do fungo *Candida albicans*.

Valarmathy et al. (2010) em extrato etanólico de folhas diversas, dentre as quais folhas de bananeira, *A. Indica* (planta indiana), grama, apresentaram inibição da bactéria *Escherichia coli* em especial o extrato etanólico de *Azadirachta indica* mostrou atividade muito mais alta contra *Escherichia coli* que outros extratos.

Com relação ao antibiótico Ciprofloxacina, usado como controle, em concentração de 5 µg pode-se afirmar que este diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) de todos extratos. Este resultado demonstra que apesar destes extratos não terem a mesma atividade antimicrobiana do composto sintético, podem ainda assim, serem usados em conjunto com este em detrimento à bactéria *Salmonella Enteritidis*, pois esta demonstrou sensibilidade aos extratos nestas concentrações propostas (MIC). Outro fator interessante a ser testado seriam concentrações maiores destes extratos, no intuito de alcançar uma maior inibição desta bactéria em comparação ao antibiótico.

Vários estudos tem sido realizados buscando relacionar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas e frutos e os constituintes responsáveis, mas ainda não há clareza nesta relação. Conforme alguns autores, a atividade antimicrobiana de extratos de frutas é ligada em grande parte aos compostos fenólicos presentes (DUNG et al., 2008; THITILERTDECHA et al., 2008; WU et al., 2008; LOGUERCIO et al., 2005).

A identificação de uma única molécula ativa que seja responsável pela atividade antimicrobiana de uma planta se torna cada vez mais improvável. Pesquisas mostram que o foco das investigações está na combinação de compostos que forneçam uma melhor eficácia. Extratos com compostos diversificados podem ser mais ativos do que componentes isolados, já que um composto individual bioativo pode ter propriedades diferenciadas na presença ou ausência de outros componentes, correspondendo a um efeito sinérgico (ESTEVINHO et al., 2008; VAN VUUREN, 2008). Este relato corrobora a idéia de que a atividade antimicrobiana, que se correlaciona à atividade antioxidante, seja composta da sinergia dos compostos, e não somente de um fitoquímico em especial.

5. Conclusões

Pode-se concluir que é possível montar um perfil fitoquímico da amora-preta cv. Tupy, cultivada em clima temperado, para diferenciar seus estádios de maturação, porém é necessária a realização de diversas determinações, uma vez que não é possível afirmar qual avaliação contribuiu em maior parte para a diferenciação dos estádios ao longo da maturação.

Outra observação, diz respeito à atividade antioxidante que aumentou ao longo da maturação, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, contudo foi observado que não é possível determinar qual composto tem maior capacidade antioxidante isoladamente, mas sim foi verificado que há um sinergismo entre os compostos fitoquímicos presentes no fruto, que variam ao decorrer do seu desenvolvimento.

Da mesma maneira, não podemos afirmar se houve um aumento na atividade antimicrobiana ao decorrer da maturação, e nem se houve um composto secundário específico responsável por esta atividade antimicrobiana, mas sim que esta existe, uma vez que a bactéria *Salmonella* Enteritidis mostrou sensibilidade aos extratos, porém com diferentes respostas.

6. Referências bibliográficas

- ABE, L.T.; MOTA, R.V.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinífera* L. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 27, p.394-400, 2007.
- ACOSTA-MONTOYA, O.; VAILLANT, F.; COZZANO, S.; MERTZ, C; PÉREZ, A.M.; CASTRO, M.V. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schldl.) during three edible maturity stages. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1497-1501, 2010.
- AGAR, I. T.; STREIF, J.; BANGERTH, F. Effect of CO₂ and controlled atmosphere (CA) on the ascorbic and dehydroascorbic acid content of some berry fruits. **Postharvest Biology and Technology**, v. 11, p. 47-55, 1997.
- ANGELO, P.M., JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- ANGELUCCI, D.E.; CARVALHO, C.R.L.; CARVALHO, P.R.N.; et al. **Análises Químicas de Alimentos – Manual técnico**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987. 56p.
- ANTUNES, L.E.C., 2002. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil-revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, v. 32, n.1, p.151-158.
- ANTUNES, L.E.C.; DUARTE, J.; SOUZA, C.M. Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. **Pesq. agropec. bras.**, v. 38, n. 3, 2003.
- ANTUNES, L.E.C.; GONÇALVES, E.D.; TREVISAN, R. Alterações da atividade da poligalacturonase e pectinametilesterase em amora-preta (*Rubus* spp.) durante o armazenamento. **R. Bras. Agrobiologia**, v. 12, n. 1, p.63-66, 2006.
- AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. Maryland: **AOAC International**, 2006.

ATALA, E.; VÁSQUEZ, L.; SPEISKY, H.; LISSI, E.; LÓPEZ-ALARCÓN. Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: an evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology. **Food Chem.** v.113, p.331-335, 2009.

AYHAN, Z.; YEOM, H. W.; ZHANG, Q.H. Flavour, color, and vitamin C retention of pulsed electric field processed orange juice in different packaging materials. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 669-674, 2001.

BRAND-WILLIAMS, W.; COUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BURDULU, H. S.; KOCA, N., KARADENIZ, F. Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n.1, p. 211-216, 2006.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

BYAMUCAMA, R.; KIREMIRE, B.T.; ANDERSEN, O.M.; STEIGEN, A. Anthocyanins from fruits of *Rubus pinnatus* and *Rubus rigidu*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 599-605, 2005.

CABRITA, M.J.; LAUREANO, O.; SILVA, J.R. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. **Anais do I Seminário Internacional de Vitivinicultura**. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, Univerdidad Técnica de Lisboa, 2003.

CHIM, J. F. **Caracterização de compostos bioativos em amora-preta (*Rubus sp.*) e sua estabilidade no processo e armazenamento de geléias convencionais e light**. 2008. 87p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)-Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CHING, L.S.; MUHAMED, S. Alpha-tocopherol content in 62 edible tropical plants. **J. of Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 3101-3105, 2001.

CHUN, J.; LEE, J.; YE, LIN; EXLER, J.; EITENMILLER, R.R. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 196–204, 2006.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v.5, n.1, p.33-40, 2004.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e métodos de seqüestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, p. 446-452, 2006.

DUNG, N. T., KIM, J. M.; KANG, S. C. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx*

operculatus (Roxb.) Merr and Perrybuds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 648-653, 2008.

ELISIA, I.; HU, C.; POPOVICH, D.G.; KITTS, D.D. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extrat. **Food Chemistry**, v. 101, p.1052-1058, 2007.

ELLINGSEN, I.; SELJEFLØT, I.; ARNESEN, H.; TONSTAD, S. Vitamin C consumption is associated with less progression in carotid intima media thickness in elderly men: A 3-years intervention study. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 19, p. 8-14, 2009.

ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A.; MOREIRA, L.; DIAS, L.G.; PEREIRA, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of North-east Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3774- 3779, 2008.

FERREYRA, R.M.; VIÑA, S.Z.; MUGRIDGE, A.; CHAVES, A.R. Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva. **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 27-32, 2007.

FRANKE, A.A.; CUSTER, L.J.; ARAKAKI, C.; MURPHY, S.P. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 1-35, 2004.

GARCÍA-ALONSO, M.; PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVASGONZALO, J. C. (2004). Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p. 13-18, 2004.

GEORGE, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M..J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 1370-1373, 2005.

GOOGLE, Imagens. www.google.com.br (cienciabrasil.blogspot.com; pt.wikipedia.org). Acesso em: 19/02/2011.

GRANADO-LORENCIO, F.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; HERRERO-BARBUDO, C.; BLANCO-NAVARRO, I.; PÉREZ-SACRISTÁN, B.; BLÁZQUEZ-GARCIA, S. In Vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetable. **Food Chemistry**, v. 102, p. 641-648, 2007.

HAENEN, G.R.M.M.; ARTS, M.J.T.J.; BAST, A.; COLEMAN, M.D. Struture and activity in assessing antioxidant activity in vitro and in vivo A critical appraisal illustrated with the flavonoids. **Evairoment Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 191-198, 2006.

HÄKKINEN, S. H.; KÄRENLAMPI, S. O.; HEINONEN, I.M.; MYKKÄNEN, H.M.; TÖRRÖNEN, A.R. HPLC Method for Screening of Flavonoids and Phenolic Acids in Berries. **Journal Science Food Agricultural**, v. 77, p. 543-551, 1998.

HÄKKINEN, S. H; KÄRENLAMPI, S. O.; MYKKANEN, H. M.; HEINONEN, I.M.; TÖRRÖNEN, A.R. Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. **Eur. Food Res. Technol.** V. 212, p. 75-80, 2000.

HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M.G.; GONZÁLEZ, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. **Food chemistry**, v.96, p.654-664, 2006.

IGNARRO, L.J.; BALESTRIERI, M.L.; NAPOLI, C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: An update. **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 326–340, 2007.

KAFKAS, E.; KOSAR, M.; TÜREMIS, N.; et al. Analysis of sugar, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. **Food Chemistry**, v. 97, p. 732-736, 2006.

KALLITHRAKA, S.; MOHDALY, A.A.; MAKRIS, D.P.; KEFALAS, P. Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 375-386, 2005.

KONKA, I; KARADENIZ, B. Antioxidant propriets of blackberry and blueberry fruits grown in the Sea Region of Turkey. **Scientia Horticulturae**, v. 121, p. 447-450, 2009.

KRINSKI, N.I. Carotenoids as antioxidants. **Nutrition**, v. 17, p. 815-817, 2001.

KUETE, V., WANSI, J.D., MBAVENG, A.T., KANA SOP, M.M., TCHO TADJONG, A., PENLAP BENG, V., ETOA, F.X., WANDJI, J., MARION MEYER, J.J., LALL, N. Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Teclea afzelii* (Rutaceae). **South African Journal of Botany**, v. 74, n. 4, p. 572-576, 2008.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LEE, M. T.; CHEN, B. H. Separation of lycopene and its cis isomers by liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 54, p. 613–617, 2001.

LEE, S.K.; KADER, A.A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 207-220, 2000.

LEE, J.; YE, L.; LANDEN, W.O.; EITENMILLER, R.R. Optimization of an Extraction Procedure for the Quantification of Vitamin E in Tomato and Broccoli using Response Surface Methodology. **Journal of food composition and analysis**, v. 13, p. 45-57, 2000.

LESS, D.H.; FRANCIS, F.J. Standarization of pigment analysis in cranberries. **Hortiscience**, v. 7, n. 1, p. 83-84, 1972.

LIM, Y.Y.; LIM, T.T.; TEE, J.J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 103, p.1003-1008, 2007.

LIMA, V., L., A., G.; GUERRA, N., B. Antocianinas: Atividade Antioxidante e Biodisponibilidade. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 37, p. 121-128, 2003.

LOGUERCIO, A.P., BATTISTIN, A., VARGAS, A.C., HENZEL, A., WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

MÄÄTÄ-RIIHINEN, K. R.; KAMAL-ELDIN, A.; TÖRRÖNEN, A. R. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (family *Rosaceae*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 6178-6187, 2004.

MARINOVA, D.; RIBANOVA, F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 370-374, 2007.

MARINOVA, E.M., YANISHLIEVA, N.V. Inhibited oxidation of lipids II: Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids. **Fett-Wissenschaft Technologie, Leinfelden-Echterdingen**, v. 94, n. 11, p. 428-432, 1992.

MARTINI, S.; D'ADDARIO, C.; COLACEVICH, A.; FOCARDI, S.; BORGHINI, F.; SANTUCCI, A.; FIGURA, N.; ROSSI, C. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. **International Journal of Antimicrobials Agents**, v. 34, p. 50-59, 2009.

MATASYOH, J.C., MAIYO, Z.C., NGURE, R.M., CHEPKORIR, R. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food Chemistry**, v. 113, p. 526-529, 2009.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived by HPLC with Diode-array detection. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p.3660-3667, 2002.

MERTZ, C.; CHEYNIER, V.; GÜNATA, Z.; BRAT, Z. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 8616-8624, 2007.

MOTA, R.V. Caracterização física e química de geléia de amora-preta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 539-543, 2006.

MOYER, R.A.; HUMMER, K.E.; FINN, C.E.; FREI, B.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 519-525, 2002.

MUÑOZ-ESPADA, A.C.; WOOD, K.V.; BORDELON, B.; WATKINS, B.A. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton and Marechal Foch Grapes and wines. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 6779-6786, 2004.

OLSON, J. A. Carotenoids and human health. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 49, n.1, p.7-11, 1999.

PANIZZI, L.; CAPONI, C.; CATALANO, S.; CIONI, P.L.; MORELLI, I. In vitro antimicrobial activity of extrats and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **J. Ethnopharmacology**, v. 79, p. 165-168, 2002.

PANTELIDIS, G.E.; VASILAKAKIS, M.; MANGANARIS, G.A.; DIAMANTIDIS, G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in rapsberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. **Food Chemistry**, v. 102, p. 777-783, 2007.

PAZDRO, R.; BURGESS, J.R. The role of vitamin E and stress in diabets complications. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, p. 276-286, 2010.

PERKINS-VEAZIE, P.; COLLINS, J.K.; CLARK, J.R. et al. Air shipment of 'Navaho' blackberry fruit to Europe is feasible. **HortScience**, v. 32, n. 1, p. 132. 1997.

PERTUZATTI, P. B. **Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade)** 2009. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

RASEIRA, M.C.B.; ANTUNES, L.E.C. Aspectos técnicos da cultura da amora-preta – documento 122. **Embrapa: Pelotas**, 54, 2004.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RODRIGUES-AMAYA, D.B. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: **ILSI Press**, p. 64, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Assessment of provitamin A contents of foods - the Brazilian experience. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 9, p. 196–230, 1996.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Some considerations in generating carotenoid data for food composition tables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 641-647, 2001.

ROSA, J. S., GODOY, R. L. O., NETO, J. O., CAMPOS, R. S., MATTA, V. M., FREIRE, C. A., SILVA, A. S., SOUZA, R. S. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v.27, n.4, p.837-846, 2007.

SANCHÉZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; ANCOS, B.; CANO, M.P. Nutritional characterisation of commercial traditional pasteurised tomato juices: carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity. **Food Chemistry**, v. 98, p. 646-651, 2006.

SAS INSTITUTE. SAS user's guide: statistics, version 9.1. Cary: **SAS Institute**, 2002.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 2432-2438, 2002.

SETIADIA, D. H. Vitamin E models. Shortened side chain models of α , β , γ and δ tocopherol and tocotrienol: a density functional study. **J Mol Struct**, v. 637, p.11-26, 2003.

SHAHRZAD, S.; BITSCH, I. Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography**, v. 741, p. 223-231, 1996.

SILVA, P.T.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Efeito de diferentes processamentos sobre o teor de Ácido ascórbico em suco de laranja utilizado na elaboração de bolo, pudim e geléia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p. 678-682, 2006.

SILVA, S.R.; MERCADANTE, A.Z. Composição de carotenóides de maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 254-258, 2002.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Amer. J. Enol. Vitcult.**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E.; FINN, C. E.; PEREIRA, C.B. Influence of cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (*Rubus L. Hybrids*) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 8021-8030, 2004.

SIQUEIRA, F. M. Nutrientes antioxidantes. **Ciência e Tecnologia Agroindustrial**, v.31, n.2, p.192-199, 1997.

SKEREDE, G.; WROLSTEAD, R. E.; DURST, R.W. Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). **Journal of Food Science**, v. 65, n. 2, p. 357-364, 2000.

SPEIRS, J.; BRADY, C.J. Modification of gene expression in ripening fruit. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 519-532, 1991.

STINTZING, F.C.; CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and human nutrition. **Food Science & Technology**, v. 15, p. 19-38, 2004.

- SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 95-100, 2005.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, v. 15, n.1, p. 71-81, 2002.
- TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal** – 3º ed. – Porto Alegre: Artmed, 2006. 719 p.
- TAPIERO, H.; TEW, K. D.; BA N.; MATHÉ, G. Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies?. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 56, p. 200-207, 2002.
- TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução? **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 684-688, 2002.
- THITILERTDECHA, N.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 2029-2035, 2008.
- UENOJO, M.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.
- VALAMARTHY, K.; BADU, P.A.S.; ABHILASH, M. Antimicrobial activity of ethanolic extrats of various plant leaves against selected microbial species. **E. J. Env. Agric. And Food Che.**, v. 9, n. 8, p. 1378-1382, 2010.
- VAN VUUREN, S.F. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 462-472, 2008
- VASCO, C.; RIIHINEN, K.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Phenolic compounds in *Rosaceae* fruits from Ecuador. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 1204-1212, 2009.
- VATTEM, D.A. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. **Process Biochem**, v. 40, p. 1583–1592, 2005.
- VINCI, G.; ROT, F.; MELE, G. Ascorbic acid in fruits: a liquid chromatographic investigation. **Food Chemistry**, v. 53, p. 211-214, 1995.
- VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P.C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.
- WU, V. C.; QIU, W. Q.; BUSHWAY, A.; HARPER, L. Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1834-1841, 2008.

ZADERNOWSKI, R; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic acid profiles in some small berries. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 2118-2124, 2005.

ZAFRILLA, P.; FERRERES, F; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 49, p. 3651-3655, 2001.

ZAMBIAZI, R.C. **The role of endogenous lipid components on vegetable oil stability**. 1997. 304f. Tese (Doutorado em Foods and Nutritional) - Sciences Interdepartamental Program. University of Manitoba Winnipeg, Manitoba, Canada.

ZHANG, D; HAMAUZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. **Food Chemistry**, v. 88, p. 503-509, 2004.

ZHANG, Y.; HU, X.S.; CHEN, F.; WU, J.H.; LIAO, X.J.; WANG, Z.F. Stability and colour characteristic of PEF-treated cyaniding-3-glicoside during storage. **Food Chemistry**, v. 106, p. 669-679, 2008.

ZHANG, Z.; KOU, X. L.; FUGAL, K.; ,MCLAUGHLIN, J. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts. **J. Agric. Food Chem.**, v.52 n. 4, p. 688-691, 2004.

Apêndice I

Tabela de determinações físico-químicas e fitoquímicas de amoras-pretas (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy em cinco diferentes estádios de maturação (FAEM/UFPel, Pelotas-RS, 2008/2009).