

Universidade Federal de Pelotas  
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial



Tese

**FITOQUÍMICOS E ATIVIDADE METABÓLICA DE EXTRATOS DE  
AMORA-PRETA (*Rubus sp.*) E DE MIRTILO (*Vaccinium sp.*) EM RATOS  
WISTAR**

MAGNA DA GLORIA SILVA LAMEIRO

PELOTAS, 2012

MAGNA DA GLORIA SILVA LAMEIRO  
Licenciada em Química  
M.Sc. em Ciência e Tecnologia Agroindustrial

**FITOQUÍMICOS E ATIVIDADE METABÓLICA DE EXTRATOS DE  
AMORA-PRETA (*Rubus sp.*) E DE MIRTILO (*Vaccinium sp.*) EM RATOS  
WISTAR**

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 Ciência e  
Tecnologia Agroindustrial.

Orientador: Prof. Phd. Rui Carlos Zambiasi

Co-Orientador (es): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabete Helbig

Pelotas, 2012

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

L228f   Lameiro, Magna da Gloria Silva

Fitoquímicos e atividade metabólica de extratos de amora-preta(Rubus SP.) e de mirtilo(Vaccinium SP.) em ratos wistar / Magna da Gloria Silva Lameiro ; orientador Rui Carlos Zambiasi; co-orientador Elizabete Helbig - Pelotas,2012.-99f. : il..- Tese (Doutorado ) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1.Amora-preta 2.Radicais livres 3.Mirtilo 4.Fitoquímicos  
5.rato I.Zambiasi, Rui Carlos(orientador) II.Título

CDD 664.8

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>a</sup>. Elizandra Braganhol, Dr. CQQFA - UFPEL

---

Prof<sup>a</sup>. Josiane Chim, Dr<sup>a</sup>, CCQ – UFPEL

---

Prof<sup>a</sup>. Leonor Almeida de Souza Soares, Dr<sup>a</sup>.  
PPGECA-FURG

---

Prof<sup>a</sup>. Elizabete Helbig, Dr<sup>a</sup>. Nutrição – UFPEL  
(Co-orientadora)

---

Prof. Rui Zambiasi, PhD. CCQFA - UFPEL

**Dedico este trabalho as pessoas que foram imprescindíveis para  
esta conquista**

Em primeiro lugar a minha família, aos meus pais Maria e João que mesmo em memória estiveram comigo nesta jornada e sua lembrança viva permanecerá em mim.

Ao meu filho Pablo e minha irmã Ana que estiveram sempre ao meu lado, me apoiando e cuidando de mim, cada um à sua maneira.

***Muito obrigada pelo amor e companheirismo, amarei vocês sempre***

Em segundo lugar aos meus amigos, por acreditarem em mim até nas horas em que eu mesma desacreditei cada um de uma forma, desempenhando um papel ímpar na minha caminhada, e sem os quais, talvez não tivesse conseguido.

**Muito obrigada a vocês que sempre estarão no meu coração, pois são pessoas muito especiais.**

**Elizabete Helbig,**

**Helen Sanches**

**Maria Inês Machado**

**Marilda Douglas**

**Pedro José Sanches Filho**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, essa força maior que nos conduz, por não me deixar vencer pelo cansaço, e fazer a vontade de aquisição de conhecimento ser mais forte que qualquer obstáculo.

Ao meu orientador, Prof. PhD Rui Zambiasi, pela amizade e extrema competência, pelo seu olhar crítico e preciso; sua praticidade e rapidez de raciocínio lógico, que me obrigou a aprender muito, e principalmente me fez crescer. Por ter me ensinado que para fazer ciência é necessário sermos em primeiro lugar seres pensantes analiticamente. O meu muito obrigado pela confiança.

Obrigada pela confiança, entusiasmo e valiosa experiência da Co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabete Helbig, que me orientou no ensaio biológico, com horas infindáveis de explicações. Com seu desprendimento por ensinar, torna-se imprescindível citá-la como um exemplo profissional.

Aos Professores do Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial (PPGCTA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Aos Membros da Banca de Qualificação que, Prof<sup>a</sup>. Josiane Chim, Prof<sup>a</sup>. Leonor Almeida de Souza Soares e Prof Pedro José Sanches Filho, com sua experiência científica e conceituada qualificação, enriqueceram as discussões desta Tese.

Aos colegas pós-graduandos Ana Paula, Andressa, Josiane, Marla, Carol, Cristiane e todos os demais colegas.

A colega e amiga Maria Inês Machado, que compartilhou o laboratório, no terceiro turno, no final de semana, que graças à sua companhia foi possível sermos conhecidas como o terceiro turno.

Ao Prof. José Cláudio Fonseca Moreira e ao doutorando Guilherme Antônio Behr do laboratório do Centro de Estudos em Estresse Oxidativo do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela atenção e colaboração na realização das análises bioquímicas.

Ao médico veterinário Rafael Aldrighi Tavares, às colegas Lucia Rota, as alunas de graduação em nutrição, o graduando em enfermagem Iver Folha, a amiga Ana Bender, pelo auxílio na eutanásia dos animais.

Aos funcionários do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas pelo apoio a este trabalho.

Pelo apoio recebido dos funcionários da vigilância da UFPel, quando tínhamos que permanecer no campus nos finais de semana.

Ao Prof. Airton Rombald, pelo apoio estatístico, e amizade.

À Faculdade de Nutrição da UFPel, por possibilitar a realização do ensaio biológico.

Aos amigos, Ari, Armando, Dina, Iara, e Lurdes, que apenas com um oi, me auxiliavam quando estava fraquejando.

Minha amiga Adriana Rodrigues Machado - que me auxiliou nesta tarefa final.

Aos meus alunos, em especial ao Juliano, aos meus colegas Gilberto e Nice e as minhas colegas de escola em especial a Ana Elisa, Lea, Mara, Mari, Maria Alice, Sabrina e Sonia e que seguraram a pontas para eu pudesse estar em dois lugares ao mesmo tempo.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

O ser humano vivência a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior.

*Albert Einstein*



LAMEIRO, Magna da Gloria Silva. **Fitoquímicos e atividade metabólica de extratos de amora-preta (*Rubus sp.*) e de mirtilo (*Vaccinium sp.*) em ratos wistar**, 2012. 99f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial– DCTA.Universidade Federal de Pelotas, Pelotas,RS.

## RESUMO

A atividade metabólica normal do organismo contribui para o estresse oxidativo com danos ao DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis. Dietas hipercolesterolêmicas, destacam-se como um fator acelerador da produção de radicais livres nos seres vivos, contribuindo para o surgimento de doenças degenerativas. Alguns compostos bioativos presentes na amora-preta (*Rubus spp.*) e no mirtilo (*Vaccinium sp.*) possuem a capacidade de atuar como antioxidante natural tornando o alimento capaz de minimizar efeitos causados no organismo por espécies reativas do oxigênio. Baseado nesse contexto propôs-se a avaliação de polpas concentradas, diluídas (50% e 75%) e liofilizadas de amora-preta e mirtilo, através de suas características físico-químicas, quantificação de compostos fitoquímicos e do seu potencial antioxidante. Para a avaliação da ação antioxidante no organismo de ratos *wistar*, machos, adultos, utilizou-se bebidas compostas por amora-preta e mirtilo, com concentrações de 50% e 75%, oferecidas aos modelos biológicos diariamente, sendo estes alimentados com dietas normolipídicas (AIN-93M) e hipercolesterolêmicas (acrescida de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol cristalino (p/p)). Foram utilizados 60 ratos, cepa *Wistar*, com peso médio de  $275,29 \pm 26,32$ g, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas, RS, estes distribuídos aleatoriamente em dez grupos experimentais, seis por grupo, sendo que cinco grupos receberam a dieta hiperlipídica e cinco dieta normolipídica, tendo um grupo controle em cada série. Oito grupos receberam diariamente, 5 mL da polpa de amora ou de mirtilo, nas concentrações de 50% e 75%. Avaliou-se o ganho de peso, consumo de dieta, lipídeos fecais e hepáticos, perfis lipídicos hepáticos e séricos e o peso do fígado. Dosou-se o colesterol total e frações, triacilgliceróis hepático e sérico. Foi quantificado no fígado e no córtex frontal, o dano oxidativo lipídico (TBARS) e proteico (SH), atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) e o teste não-enzimático de defesa antioxidante (TRAP). A polpa de mirtilo apresentou efeito redutor sobre os níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol total, colesterol-LDL e colesterol-VLDL, mostrando influência significativa nas concentrações de HDL em ratos *Wistar* normo e hipercolesterolêmicos. Diante dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que as polpas de frutas de amora-preta (*Rubus sp.*) e de mirtilo (*Vaccinium sp.*) apresentaram atividade antioxidante, no entanto, a intensidade dessa ação foi diferenciada entre elas. Destacando-se com o maior potencial antioxidante *in vitro*, o mirtilo.

**Palavras-chave:** radicais livres, amora-preta, mirtilo, fitoquímicos, rato.

LAMEIRO, Magna da Gloria Silva. **Phytochemicals and metabolic activity of extracts of blackberry (*Rubus sp.*) And blueberry (*Vaccinium sp.*) In Wistar rats**, 2012. 99f Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial – DCTA. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas

## ABSTRACT

The body's normal metabolic activity contributes to oxidative stress with damage to DNA, RNA, proteins and other oxidizable substances. Hypercholesterolemic diet, stand out as an accelerating factor in the production of free radicals in living beings, contributing to the onset of degenerative diseases. Some bioactive compounds in blackberry (*Rubus spp.*) And blueberry (*Vaccinium sp.*) Have the ability to act as natural antioxidant food becoming able to minimize effects on the body caused by reactive oxygen species. Based on this context it was proposed to assess pulp concentrated, diluted (50% and 75%) and lyophilized blackberry and blueberry, through its physical and chemical characteristics, quantification of phytochemical compounds and their antioxidant potential. To evaluate the antioxidant in the body of Wistar rats, adult male, was used for mixed drinks blackberry and blueberry, with concentrations of 50% and 75% offered daily to biological models, which are fed diets normolipídicas (AIN-93M) and hypercholesterolemic (plus 0.1% cholic acid, 1% crystalline cholesterol (w / w)). A total of 60 rats, Wistar strain, average weight of  $275.29 \pm 26.32$  g, from the Vivarium of the Federal University of Pelotas, RS, these randomly divided into ten experimental groups, six per group, and five groups fed rations hyperlipidemic and five normolipídica diet, having a control group in each series. Eight groups received daily 5mL pulp blackberry and blueberry, at concentrations of 50% and 75%. We evaluated weight gain, feed intake, fecal and liver lipids, liver and serum lipid profile and liver weight. Dosed if the total cholesterol, triglycerides and liver and plasma. Was quantified in liver and frontal cortex, lipid oxidative damage (TBARS) and protein (SH), antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) test and non-enzymatic antioxidant defense (TRAP). The pulp had blueberry lowering effect on serum triglycerides, total cholesterol, LDL-cholesterol and VLDL-cholesterol, showing a significant influence on HDL in rats with normal and hypercholesterolemic. Results obtained in this study, we conclude that the fruit pulp from blackberry (*Rubus spp.*) And blueberry (*Vaccinium sp.*) Showed antioxidant activity, however, the intensity of this action was different for them. Standing out with the highest antioxidant potential in vitro, the blueberry.

Keywords: free radicals, blackberry, blueberry, phytochemicals, mouse.

## LISTA DE FIGURAS

|                    |                                                                                                                             |    |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.1</b>  | Amoreira-preta ( <i>Rubus sp.</i> ) e seus frutos                                                                           | 04 |
| <b>Figura 1.2</b>  | Fruto Mirtilo ( <i>Vaccinium ashei</i> )                                                                                    | 07 |
| <b>Figura 1.3</b>  | Classificação dos fitoquímicos dietéticos                                                                                   | 09 |
| <b>Figura 1.4</b>  | Estrutura básica dos flavonóides e não flavonóides                                                                          | 10 |
| <b>Figura 1.5</b>  | Estrutura química das antocianinas                                                                                          | 11 |
| <b>Figura 1.6</b>  | Patologias causadas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio                                                          | 13 |
| <b>Figura 2.1</b>  | Cromatograma típico de compostos fenólicos em amora-preta cv. Tupy por CLAE                                                 | 57 |
| <b>Figura 2.2</b>  | Cromatograma típico de compostos fenólicos em mirtilo cv. Powderblue por CLAE                                               | 57 |
| <b>Figura 2.3</b>  | Cromatograma típico da separação de antocianinas de amora-preta por CLAE                                                    | 58 |
| <b>Figura 2.4</b>  | Cromatograma típico da separação de antocianinas e antocianinas em mirtilo por CLAE                                         | 58 |
| <b>Figura 2.5</b>  | Cromatogramarelativo a separação de carotenóides em amora-preta cv. Tupy por CLAE                                           | 59 |
| <b>Figura 2.6</b>  | Cromatograma relativo a separação de carotenóides em mirtilo por CLAE                                                       | 59 |
| <b>Figura 2.7</b>  | Cromatograma típico de tocoferóis em amora-preta cv. Tupy por CLAE                                                          | 60 |
| <b>Figura 2.8</b>  | Cromatograma típico de tocoferóis em mirtilo cv. Powderblue por CLAE                                                        | 60 |
| <b>Figura 2.9</b>  | Cromatograma típico da vitamina C em amora-preta cv. Tupy, por CLAE                                                         | 61 |
| <b>Figura 2.10</b> | Cromatograma típico da vitamina C em polpa de mirtilo. Cv. Powderblue, por CLAE                                             | 61 |
| <b>Figura 2.11</b> | Correlação entre o conteúdo total de compostos fenólicos e de antocianinas totais como os valores de atividade antioxidante | 62 |

em TEAC ( $\mu\text{molg}^{-1}$ ) de amora-preta

**Figura 2.12** Correlação entre o conteúdo total de compostos fenólicos e de antocianinas como os valores de atividade antioxidante em TEAC ( $\mu\text{molg}^{-1}$ ) de mirtilo. 62

**Figura 3.1** Coeficiente de eficiência alimentar de dietas oferecidas à ratos machos *Wistar*/UFPel durante 30 dias Série 1 P (AIN-93M) e Série 2 C (AIN-93M -com suplementação de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol). 74

**Figura 3.2** Fígados dos ratos machos *Wistar*/UFPel alimentados durante 30 dias. Dieta normolipídica 78

**Figura 3.3** Fígados dos ratos machos *Wistar*/UFPel alimentados durante 30 dias. Dieta hipercolesterolêmicas 78

## LISTA DE TABELAS

|                    |                                                                                                                                                       |    |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 2. 1</b> | Determinações físico químicas de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue                                                                     | 52 |
| <b>Tabela 2.2</b>  | Características físico-químicas das polpas, polpas diluídas e produtos liofilizados de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue               | 52 |
| <b>Tabela 2.3</b>  | Compostos fenólicos individuais presentes na polpa e na polpa diluída de amora-preta cv. Tupy e mirtilo cv. Powderblue                                | 53 |
| <b>Tabela 2.4</b>  | Compostos antociânicos presentes em polpa in natura e nas polpas diluídas em amora-preta cv. Tupy e mirtilo cv. Podewblue                             | 53 |
| <b>Tabela 2.5</b>  | Conteúdo total de carotenóides em polpa in natura, liofilizada e diluída de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue                          | 54 |
| <b>Tabela 2.6</b>  | Conteúdo de carotenóides em polpa liofilizada, polpa in natura e polpa diluída de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue                    | 54 |
| <b>Tabela 2.7</b>  | Conteúdo de tocoferóis da polpa liofilizada, da polpa e polpa diluída de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue                             | 55 |
| <b>Tabela 2.8</b>  | Conteúdo de ácido L-ascórbico na polpa liofilizada, da polpa e polpa diluída e de amora-preta cv. Tupy e mirtilo cv. Powderblue.                      | 55 |
| <b>Tabela 2.9</b>  | Atividade antioxidante da polpa in natura, da polpa diluída e da polpa liofilizada de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue                | 56 |
| <b>Tabela 3.1</b>  | Formulação das dietas AIN-93 (Padrão) e Controle (Colesterol) em g.Kg <sup>-1</sup>                                                                   | 67 |
| <b>Tabela 3.2</b>  | Peso corporal inicial e final (g), ganho de peso (g) e consumo diário de ração de ratos submetidos a diferentes dietas normolipídicas durante 30 dias | 72 |

|                    |                                                                                                                                                                                 |    |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 3.3</b>  | Peso corporal inicial e final (g), ganho de peso (g) e consumo diário de ração de ratos submetidos a diferentes dietas hipercolesterolêmicas durante 30 dias                    | 73 |
| <b>Tabela 3.4</b>  | Lipídeos Totais Hepáticos e Fecais, peso do fígado dos ratos machos Wistar/UFPeI alimentados durante 30 dias com as dietas normolipídicas experimentais                         | 75 |
| <b>Tabela 3.5</b>  | Lipídeos Totais Hepáticos e Fecais, peso do fígado dos ratos machos Wistar/UFPeI alimentados durante 30 dias com as dietas hipercolesterolêmicas experimentais                  | 76 |
| <b>Tabela 3.6</b>  | Colesterol total e triacilglicerol (mg.dL <sup>-1</sup> ) hepáticos dos ratos machos Wistar/UFPeI alimentados durante 30 dias com as dietas normolipídicas experimentais        | 79 |
| <b>Tabela 3.7</b>  | Colesterol total e triacilglicerol (mg.dL <sup>-1</sup> ) hepáticos dos ratos machos Wistar/UFPeI alimentados durante 30 dias com as dietas hipercolesterolêmicas experimentais | 80 |
| <b>Tabela 3.8</b>  | Dosagem sorológica de colesterol total e frações (mg.dL <sup>-1</sup> ) dos ratos machos Wistar/UFPeI, alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais                  | 81 |
| <b>Tabela 3.9</b>  | Dosagem sorológica de colesterol total e frações (mg.dL <sup>-1</sup> ) dos ratos machos Wistar/UFPeI, alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais                  | 82 |
| <b>Tabela 3.10</b> | Dano oxidativo de lipídeos (TBARS) e Conteúdo Sulfidril Total (SH) dos ratos machos Wistar/UFPeI, alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais normolipídicas        | 85 |
| <b>Tabela 3.11</b> | Dano oxidativo de lipídeos (TBARS) e Conteúdo Sulfidril Total (SH) dos ratos machos Wistar/UFPeI, alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais hipercolesterolêmicas | 85 |
| <b>Tabela 3.12</b> | Capacidade antioxidante total (TRAP) dos ratos machos Wistar/UFPeI, alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais normolipídicas                                      | 88 |
| <b>Tabela 3.13</b> | Capacidade antioxidante total (% de radicais formado) dos ratos machos Wistar/UFPeI, alimentados durante 30 dias                                                                | 88 |

com as dietas experimentais hipercolesterolêmicas

**Tabela 3.14** Atividades enzimáticas da superóxido-dismutase (SOD) e 89  
catalase (CAT) no córtex cerebral e fígado dos ratos  
machos *Wistar/UFPel*, alimentados durante 30 dias com as  
dietas experimentais normolipídicas

**Tabela 3.15** Atividades enzimáticas da superóxido-dismutase (SOD) e 90  
catalase (CAT) no córtex cerebral e fígado dos ratos  
machos *Wistar/UFPel*, alimentados durante 30 dias com as  
dietas experimentais hipercolesterolêmicas

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                     | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1.0      INTRODUÇÃO GERAL                                                                                                                                                                           | 01     |
| <br>CAPITULO I      REVISÃO BIBLIOGRÁFICA                                                                                                                                                           |        |
| 1.1      PEQUENAS FRUTAS                                                                                                                                                                            | 03     |
| 1.2      AMORA – PRETA                                                                                                                                                                              | 04     |
| 1.3      MIRTILO                                                                                                                                                                                    | 06     |
| 1.4      FITOQUÍMICOS                                                                                                                                                                               | 08     |
| 1.5      RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO                                                                                                                                                       | 12     |
| 1.6      ATIVIDADE PROTETORA DOS ANTIOXIDANTES                                                                                                                                                      | 14     |
| 1.7      AÇÃO BIOLÓGICA DA AMORA-PRETA E DO MIRTILO                                                                                                                                                 | 15     |
| 2.0      REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICOS                                                                                                                                                                | 17     |
| <br>CAPITULO II      CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA AMORA-PRETA ( <i>Rubus fruticosus</i> ) E MIRTILO ( <i>Vaccinium ashei reade</i> ) E CONTEÚDO DE FITOQUÍMICOS EM SEUS PRODUTOS LIOFILIZADOS |        |
| RESUMO                                                                                                                                                                                              | 25     |
| 1.0      INTRODUÇÃO                                                                                                                                                                                 | 26     |
| 2.0      MATERIAL E MÉTODOS                                                                                                                                                                         | 28     |
| 2.1      MATERIAL                                                                                                                                                                                   | 28     |
| 2.2      PROCESSAMENTO DAS POLPAS                                                                                                                                                                   | 29     |
| 2.3      PROCESSAMENTO DOS PRODUTOS LIOFILIZADOS                                                                                                                                                    | 29     |
| 2.4      AVALIAÇÕES                                                                                                                                                                                 | 29     |
| 2.5      ANÁLISE ESTATÍSTICA                                                                                                                                                                        | 35     |
| 3.0      RESULTADOS E DISCUSSÃO                                                                                                                                                                     | 35     |
| 3.1      DETERMINAÇÕES FÍSICO QUÍMICAS DE AMORA-PRETA CV. TUPY E DE MIRTILO CV. POWDERBLUE                                                                                                          | 35     |
| 3.2      DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS NAS POLPAS, POLPAS DILUÍDAS E NOS PRODUTOS LIOFILIZADOS                                                                                                      | 37     |
| 3.3      CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS                                                                                                                                                | 38     |



|     |                                      |    |
|-----|--------------------------------------|----|
| 3.4 | CONTEÚDO DE ANTOCIANINAS INDIVIDUAIS | 40 |
| 3.5 | CONTEÚDO TOTAL DE CAROTENÓIDES       | 41 |
| 3.6 | CONTEÚDO DE CAROTENÓIDES INDIVIDUAIS | 41 |
| 3.7 | CONTEÚDO DE TOCOFERÓIS               | 42 |
| 3.8 | CONTEÚDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO          | 43 |
| 3.9 | ATIVIDADE ANTIOXIDANTE               | 44 |
| 4.0 | CONCLUSÕES                           | 45 |
| 5.0 | REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICOS          | 47 |
|     | TABELAS                              | 52 |
|     | FIGURAS                              | 57 |

**CAPÍTULO III      EFEITO BIOLÓGICO DE EXTRATOS DE AMORA-PRETA (*Rubus sp.*)  
E DE MIRTILO (*Vaccinium sp.*) EM RATOS WISTAR**

|       |                                                       |    |
|-------|-------------------------------------------------------|----|
| 1.0   | INTRODUÇÃO                                            | 63 |
| 2.0   | MATERIAL E MÉTODOS                                    | 64 |
| 2.1   | POLPAS DILUIDAS DE AMORA-PRETA E DE MIRTILO           | 64 |
| 2.2   | ENSAIO BIOLOGICO                                      | 65 |
| 2.2.1 | ANIMAIS                                               | 65 |
| 2.2.2 | DIETAS                                                | 66 |
| 2.3   | DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS HEPÁTICOS E<br>FECAIS | 68 |
| 2.4   | AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS                                | 68 |
| 2.4.1 | DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL TOTAL SÉRICO E<br>HEPÁTICO | 69 |
| 2.4.2 | DETERMINAÇÃO DE TRIACILGLICEROL SÉRICO E<br>HEPÁTICO  | 69 |
| 2.4.3 | DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL VLDL SÉRICO                | 69 |
| 2.4.4 | DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL LDL SÉRICO                 | 69 |
| 2.5   | ENZIMAS ANTIOXIDANTES                                 | 70 |
| 2.5.1 | SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)                            | 70 |
| 2.5.2 | CATALASE (CAT)                                        | 70 |
| 2.6   | CONTEÚDO SULFIDRILA TOTAIS (SH)                       | 70 |

|            |                                                                                                                     |           |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.7</b> | <b>TESTE NÃO-ENZIMÁTICO DE DEFESA ANTIOXIDANTE</b>                                                                  | <b>71</b> |
| <b>2.8</b> | <b>DANO OXIDATIVO DE LIPÍDEOS</b>                                                                                   | <b>71</b> |
| <b>2.9</b> | <b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>                                                                                          | <b>72</b> |
| <b>3.0</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                       | <b>72</b> |
| <b>3.1</b> | <b>INDICATIVOS BIOLÓGICOS DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS</b>                                                             | <b>72</b> |
| <b>3.2</b> | <b>LIPÍDEOS TOTAIS: HEPÁTICOS E FECAIS</b>                                                                          | <b>75</b> |
| <b>3.3</b> | <b>COLESTEROL TOTAL E TRIACILGLICEROL HEPÁTICO</b>                                                                  | <b>79</b> |
| <b>3.4</b> | <b>DOSAGENS SOROLÓGICAS DE COLESTEROL E<br/>TRIACILGLICERÓIS</b>                                                    | <b>81</b> |
| <b>3.5</b> | <b>CONTEÚDO SULFIDRILA TOTAIS (SH) E DANO OXIDATIVO<br/>DE LIPÍDEOS (TBARS) NO CORTEX CEREBRAL E DO<br/>FÍGADO</b>  | <b>84</b> |
| <b>3.6</b> | <b>POTENCIAL ANTIOXIDANTE TOTAL NÃO ENZIMÁTICO<br/>(TRAP) NO CÓRTEX CEREBRAL E FÍGADO</b>                           | <b>87</b> |
| <b>3.7</b> | <b>ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA SUPERÓXIDO-DISMUTASE<br/>(SOD) E CATALASE (CAT) NO CÓRTEX CEREBRAL E NO<br/>FÍGADO</b> | <b>89</b> |
| <b>4.0</b> | <b>CONCLUSÕES</b>                                                                                                   | <b>91</b> |
| <b>4.1</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>                                                                                         | <b>92</b> |
| <b>5.0</b> | <b>REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICOS</b>                                                                                  | <b>93</b> |
|            | <b>ANEXO</b>                                                                                                        | <b>99</b> |

## 1.0 INTRODUÇÃO GERAL

A incorporação de frutas e hortaliças na dieta alimentar está em ascensão nos últimos anos, decorrente da valorização de seu valor nutritivo, reduzido valor calórico e pelos seus efeitos terapêuticos. Estudos recentes relacionam a ingestão de frutas com propriedades antioxidantes e a redução do risco e desenvolvimento de algumas doenças crônico-degenerativas (WICKLUND et al., 2005). Extratos de vegetais, cereais e seus subprodutos industriais são ricos em antioxidantes, incluindo o ácido L-ascórbico, tocoferóis, carotenóides e compostos fenólicos, os quais têm demonstrado atividade antioxidante eficaz em modelos biológicos (WOLFE et al., 2003). Antioxidantes são substâncias capazes de inibir o processo oxidativo, pela redução da quantidade de radicais livres no organismo (PIENIZ, 2009).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons decorrentes do metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Contudo, a concentração desses radicais no organismo pode tornar-se elevada, devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidativos naturais, podendo passar à condição de pró-oxidantes. O desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes, que resulta na indução de danos celulares por ação dos radicais livres, tem sido denominado estresse oxidativo (BIANCHI & ANTUNES, 1999; TAVARES, 2000; BARREIROS et al., 2006). A defesa contra o estresse oxidativo é realizada por compostos de ação antioxidante presentes nos alimentos e pelas enzimas catalase (CAT), glutathione reduzida (GSH), glutathioneperoxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) (TAVARES, 2000; BARREIROS et al., 2006).

A oxidação de componentes das membranas celulares pode promover alteração destas, como perda da fluidez, alteração da função secretora, alteração dos gradientes iônicos transmembrana, perda da seletividade na troca iônica com liberação do conteúdo de organelas, o que leva à formação de produtos citotóxicos causando a morte celular (PIENIZ, 2009).

Os antioxidantes apresentam-se como alternativa para prevenir a oxidação *in vivo* e a deterioração oxidativa dos alimentos, e minimizar os danos oxidativos nos seres vivos.

Compostos com ação antioxidante estão naturalmente presentes em frutas, sendo que algumas apresentam altas concentrações de determinados grupos. A

amora-preta e o mirtilo apresentam grandes concentrações de determinados grupos de flavonóides como antocianinas, flavonóis e flavonas. A incorporação destas frutas na dieta poderia atenuar o dano oxidativo molecular, contribuindo para a redução ou controle de doenças degenerativas.

### **OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito dos compostos bioativos presentes em extratos de amora-preta e de mirtilo no metabolismo lipídico e na ação antioxidante em ratos *Wistar*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Caracterizar fisicoquimicamente a amora-preta e o mirtilo, e avaliar o efeito do processamento na estabilidade de fitoquímicos no fruto e em suas polpas diluídas e liofilizados.

Avaliar a ação antioxidante e hipolipemiante de extratos de amora-preta e de mirtilo no organismo de ratos *wistar*.

## CAPITULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 PEQUENAS FRUTAS

As “pequenas frutas” ou *small fruit*, apresentam alta popularidade no hemisfério Norte, em contrapartida, à exceção do morango, são ainda pouco conhecidas pelo consumidor brasileiro. O estudo das propriedades funcionais destas frutas, e a vinculação de sua ação antioxidante, proporcionaram um aumento na sua popularidade.

A literatura aponta que as pequenas frutas podem bloquear a ação de radicais livres desencadeadores de tumores cancerosos. Vários compostos lipofílicos e hidrofílicos são encontrados em frutas vermelhas, cujas propriedades biológicas têm sido atribuídas aos altos níveis e ampla diversidade de compostos fenólicos (HIRSCH, 2011). Porém, acredita-se que o efeito complementar, aditivo ou sinérgico, resultante dos diversos componentes seja o responsável pelas propriedades biológicas benéficas ao invés de uma única classe ou composto químico isolado (FERREIRA, et al., 2010).

No Brasil ainda é pequena a área plantada, e por consequência a oferta de pequenas frutas diante o potencial do mercado. Segundo dados da Emater-RS (APPEFRUTAS, 2010) as pequenas frutas como o mirtilo, a amora e a framboesa, foram responsáveis por um incremento médio da produção gaúcha de 25% ao ano nos últimos dois anos. A comercialização de frutas *in natura* exige uma apurada logística devido à sua alta perecibilidade. As ações que objetivam a capacitação de técnicos e produtores e que promovam a qualidade e a divulgação das pequenas frutas para o mercado, são fundamentais para a consolidação dessa cadeia de produção (PAGOT, 2010). A rentabilidade deste tipo de frutas por hectare é alta, vinculada a valores de mercado elevados, justificada pelo fato que essas frutas são consideradas raras e com grande apelo mercadológico, por possuírem elevados teores de substâncias antioxidantes e anticancerígenas (PAYNE, 2005).

As ações que objetivam a capacitação de técnicos e produtores e que promovam a qualidade e a divulgação das pequenas frutas para o mercado são fundamentais para a consolidação dessa cadeia de produção (PAGOT, 2010).

## 1.2 AMORA – PRETA

A amora-preta (*Rubus spp.*) pertence à família Rosaceae, gênero *Rubus*, grupo diverso e bastante difundido, para o qual se estima existir entre 400 a 500 espécies. É uma pequena fruta de clima temperado, possui coloração atraente, variando do vermelho púrpura ao azul devido ao elevado teor de antocianinas (FERREIRA, 2010). Esta espécie frutífera apresenta-se como uma alternativa promissora de renda, principalmente para as pequenas propriedades familiares, por tratar-se de uma cultura rústica, com menor incidência de pragas e maior adaptação aos diferentes tipos de solo e condições climáticas.

Esta frutífera possui porte ereto ou rasteiro, com frutos pesando cerca de quatro a sete gramas, de coloração negra (Figura 1.1) e sabor ácido a doce-ácido. O fruto verdadeiro da amoreira é denominado de mini drupa ou drupete, no qual existe uma pequena semente, sendo que a sua junção forma o que é denominado de fruto agregado (HIRSCH, 2011).



**Figura 1.1.** Amoreira-preta (*Rubus sp.*) e seus frutos  
**Fonte:** adaptado de Antunes & Raseira (2004).

No Brasil, o cultivo comercial desta pequena fruta, iniciou com a introdução de cultivares provenientes dos Estados Unidos pela EMBRAPA – Clima Temperado de Pelotas (RS), em 1974 (POLTRONIERI, 2003; PAGOT, 2010). A partir desses materiais genéticos importados, surgiram algumas cultivares brasileiras, com grande destaque para a cultivar Tupy, que abrange mais de 90% da área de cultivo no Brasil (CHIM, 2008).

O estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor brasileiro deste fruto, com uma área estimada em 272 ha. Os municípios de Vacaria e Campestre da Serra concentram as maiores áreas de plantação, com uma estimativa de mais de 70% da área do estado do Rio Grande do Sul, perfazendo um total de 200,0 ha de cultivo (LIPP & CONTE, 2007). A amora-preta também é cultivada em menor escala em Santa Catarina, Paraná e na Região serrana de Minas Gerais e de São Paulo. A maior demanda pela fruta é de São Paulo, principal consumidor, mas outras capitais como Rio de Janeiro, Porto Alegre, Curitiba, Brasília, Goiânia e Belo Horizonte vêm apresentando crescimento no consumo (EMATER/RS –ASCAR –Dados não publicados, 2010.b).

A variedade 'Tupy' apresenta plantas de porte ereto, com espinho, produz frutas com peso médio de 6 g, película externa resistente, coloração preta e uniforme, com sementes pequenas e um sabor equilibrado em acidez e açúcar (ANTUNES, 2002).

O sabor diferenciado e suas propriedades funcionais são os principais atrativos da amora-preta. O elevado teor de umidade da amora, a alta taxa respiratória e a estrutura frágil do pericarpo tornam-na sensível ao armazenamento e manuseio, apresentando vida pós-colheita relativamente curta e, com isso, o seu consumo na forma *in natura* é menos frequente (ANTUNES et al., 2003).

A amora-preta é um fruto rico em compostos metabólicos secundários, principalmente em ácidos fenólicos, antocianinas, proantocianidinas e outros flavonóides (MOYER et al., 2002; SELLAPAN et al., 2002). Segundo Ferreira et al. (2010) foram identificadas quatro antocianinas em amora-preta cultivar Tupy, sendo a cianidina 3-glucosídeo a mais abundante (92,9 %). Diversos estudos apresentam uma ampla faixa do teor de antocianinas monoméricas presentes em amora-preta cultivadas nos Estados Unidos, México e Itália (67,4 a 248,0 mg de antocianinas por 100 g de fruta), isto se deve as variações em sua composição com as condições climáticas da região cultivada, a espécie, variedade e estágio de maturação (ROSSO, 2007). O teor apresentado no estudo de Ferreira et al. (2010) realizado com amora-preta Tupy comercializada no Brasil foi de 104,1  $\pm$  1,8 mg de antocianinas/ 100 g de fruta. Este resultado também está dentro da faixa apresentada para açaí, fruta considerada rica em antocianinas.

A amora-preta cv. Tupy cultivada no Brasil não apresenta alto teor de carotenóides (86,5  $\pm$  0,2 mg de carotenóides/ 100 g de fruta), conteúdo de 3 a 5

vezes inferior de amoras provenientes de outros países e outras frutas vermelhas como framboesa, ameixa e mirtilo; e conteúdos de 60 a 500 vezes inferiores de frutas amarelas, como buriti, physalis, tucumã e manga (FERREIRA et al., 2010). Os carotenóides são pigmentos naturais que conferem coloração amarela, laranja ou vermelha às frutas e vegetais, são excelentes desativadores do oxigênio singlete e alguns são precursores de vitamina A.

Diversos estudos *in vitro* determinaram a atividade antirradical de extratos de amora-preta. A atividade antioxidante da amora-preta brasileira cultivar Tupy foi ( $33,8 \pm 1,8$  mg amostra/ mg de DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila) 5 vezes maior que a apresentada para amoras desenvolvidas no sul da Itália, tal fato está relacionado com pela localização geográfica brasileira, que proporciona maior expressão de metabólitos secundários. Este valor se encontra dentro da faixa apresentada para diversas frutas tropicais brasileiras com elevado potencial antioxidante. Observa-se uma correlação direta entre o teor de compostos fenólicos e/ou o elevado teor de cianidina com a capacidade antioxidante (FERREIRA et al, 2010).

Devido a presença destes fitoquímicos, extratos de amora-preta tem demonstrado efeito antimutagênico em *Samunella* (TATE et al., 2006) e anticarcinogênico para as linhagens humanas de câncer de mama, câncer de próstata (SEERAM et al., 2006), além de auxiliarem na redução dos níveis de colesterol sanguíneo e de atuar na prevenção de enfermidades cardiovasculares e circulatórias (STONER et al., 2007), e na prevenção do diabetes e do mal de Alzheimer (ISHIGE et al., 2001).

### 1.3 MIRTILO

O mirtilo ('blueberry' ou 'arándano'), que pertence à família das Ericáceas e ao gênero *Vaccinium*, é um fruto de clima temperado que apresenta grande importância comercial, especialmente nos Estados Unidos e em alguns países da Europa (PAGOT & HOFFMANN, 2003).

A literatura descreve três grupos principais de mirtilo cultivados comercialmente, de acordo com o genótipo, hábito de crescimento da fruta, tipo de fruto produzido, além de outros atributos. O "highbush" (mirtilo gigante), originário da costa oeste da América do Norte, tendo como a principal espécie deste grupo o



*Vaccinium corymbosum* L; o "rabbiteye", originário do sul da América do Norte, o qual compreende a espécie *Vaccinium ashei* Reade; e o "lowbush", que apresenta hábito de crescimento rasteiro e produz frutos de pequeno tamanho, cujo destino é a indústria processadora.

O Rio Grande do Sul é o Estado com maior destaque na produção de mirtilo, ocupando uma área de 65 ha e produção aproximada de 150 toneladas (FACHINELLO, 2008).

Os frutos de mirtilo amadurecem 2 a 3 meses após a floração de forma irregular no ramo, exigindo várias colheitas seletivas para retirar somente os frutos maduros. Produz frutos baciformes e globosos, em geral, em torno de 1cm de diâmetro e 1,5g de peso, de coloração azul-escura, de formato achatado, coroada pelos lóbulos persistentes do cálice, pericarpo firme, com muitas sementes envolvidas em uma polpa de coloração esbranquiçada sucosa e aromática, de sabor doce-ácido (Figura 1.2).

O mirtilo é utilizado na alimentação humana por vários séculos, existem referências que datam seu consumo no Sec. XVIII, na forma *in natura* e seco, com sua utilização também para fins medicinais (SOUSA, et al., 2007). Atualmente este fruto apresenta um elevado consumo na Europa e América do Norte, devido ao apelo nutricional. No Brasil, seu consumo está vinculado aos conceitos de saúde e sofisticação. Sua disponibilidade, versatilidade e variedade de formas de apresentação, permitem que seja incorporado em uma ampla variedade de formulações durante quase todo o ano (PAYNE, 2005).



**Figura 1.2.** Fruto Mirtilo (*Vaccinium ashei*).  
**Fonte:** adaptado de Pertuzatti (2009).

O mirtilo não é apenas um fruto saboroso, apresenta alto conteúdo de pigmentos antociânicos, os quais agem de maneira benéfica no organismo, pelo combate aos radicais livres, pela ação antiinflamatória, por reduzir a fração lipoproteica de baixa densidade (LDL), e aos benefícios ligados à saúde dos olhos (FACHINELLO, 2008).

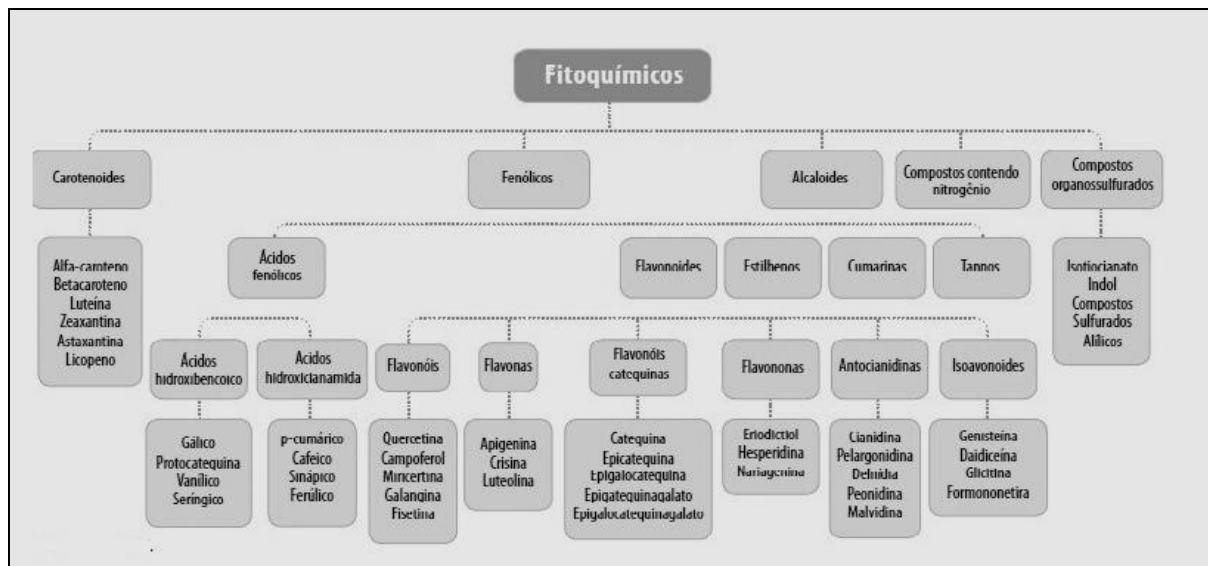
Dentre os fitoquímicos presentes no mirtilo, os compostos fenólicos merecem destaque, devido à sua atividade antioxidante. De acordo com Zheng & Wang (2003), o alto nível de capacidade antioxidante encontrado no mirtilo ajuda a neutralizar os radicais livres, os quais são moléculas instáveis que estão ligadas ao aparecimento de um grande número de doenças degenerativas. Segundo Sellapam et al. (2002), a combinação das 11 antocianinas presentes no mirtilo responde por 56,3% do valor total de capacidade antioxidante. Sendo assim dietas que contenham mirtilo podem prevenir problemas relacionados a doenças neurodegenerativas que incluem o Mal de Alzheimer, o Mal de Parkinson e a esclerose lateral. As antocianinas apresentam expressiva presença na casca do fruto. Na polpa, por sua vez, as procianidinas estão em maior quantidade (KAISU et al., 2008). Zhang et al. (2005) constataram o efeito inibitório das antocianinas cianidina, delfinidina, pelargonidina, petunidina e malvidina na proliferação de células cancerígenas humanas, originadas em diferentes órgãos do corpo: estômago, cólon, mama, pulmão e sistema nervoso central.

A composição de antocianinas e de polifenóis das variedades de mirtilo “Highbush” doméstico (*Vaccinium corymbosium*), “Lowbush” (*Vaccinium angustifolium*), “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e Mirtilo nativo europeu (*Vaccinium myrtillus*), são qualitativamente muito similares. Outros flavonóides de importância são os flavonóis, incluindo o 3-O-glicosídeo da quercetina e campferol, catequina, epicatequina, e diversas proantocianidinas. Segundo Belitz & Grosch (1997), dentre as antocianinas presentes no mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) são predominantemente a Petunidina-3-Glicosídeo, Cianidina-3-Glicosídeo, Petunidina-Glicosídeo, Delfinidina-3-Glicosídeo, Delfinidina-3-Galactosídeo e a Malvidina-3-Glicosídeo.

#### 1.4 FITOQUÍMICOS

Os fitoquímicos (figura 1.3) são compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas, sendo substâncias biologicamente ativas, que conferem cor,

sabor, odor e proteção as plantas contra estresse oxidativo. Muitos desses compostos possuem atividades biológicas potentes em mamíferos, e alguns podem apresentar efeitos tóxicos quando ingeridos em altas doses (CARDOSO, 2009).



**Figura 1.3 - Classificação dos fitoquímicos dietéticos**  
**Fonte:** LIU, 2004

A formação de muitos destes fitoquímicos está relacionada ao amadurecimento das frutas, onde ocorre 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.

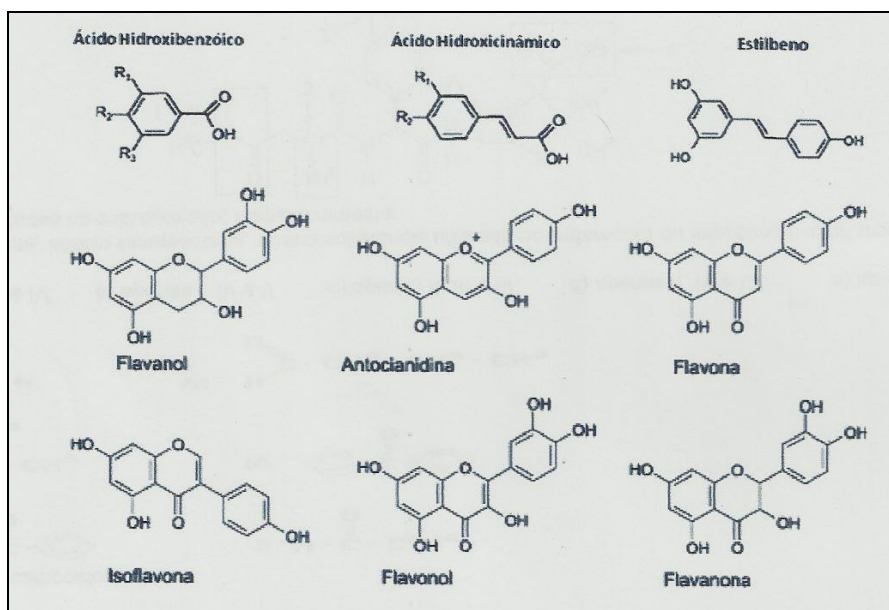
A atividade biológica das frutas vermelhas, como da amora-preta e do mirtilo, é parcialmente atribuída ao seu elevado teor e variedade de fitoquímicos, principalmente dos flavonóides (antocianinas, flavonóis e flavanóis) e dos ácidos fenólicos (derivados do ácido hidroxibenzóico e hidroxicinâmicos), mas também de taninos (proantocianidinas, elagitatinos e galotaninos), dos estilbenóides (como o resveratrol) e de lignanas (SEERAM, 2006). No entanto, a atividade biológica de amora-preta e de mirtilo está relacionada principalmente em função da presença de compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de substâncias químicas que incluem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, derivadas da fenilalanina e da tirosina (NACZK & SHAHIDI, 2006). Sua estrutura molecular básica é constituída por anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Esses compostos químicos pertencem a um grupo heterogêneo com aproximadamente 10.000 compostos. Os polifenóis

estão divididos em dois grandes grupos: os flavonóides, subdivididos em flavonas, flavanóis, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas; e os não flavonóides, que compreendem os grupos dos ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (Fig 1.4) (LI et al., 2009). Estes compostos podem atuar como agentes redutores nas reações de oxi-redução, como inibidores de radicais livres, como quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete.

A presença de compostos fenólicos específicos em cada fruta pode estar relacionada a fatores como o tipo, variedade, localização geográfica da planta, condições ambientais e climáticas durante o crescimento da planta, assim como incidência de doenças (KING & YOUNG, 1999; ROSS & KASUM, 2002).

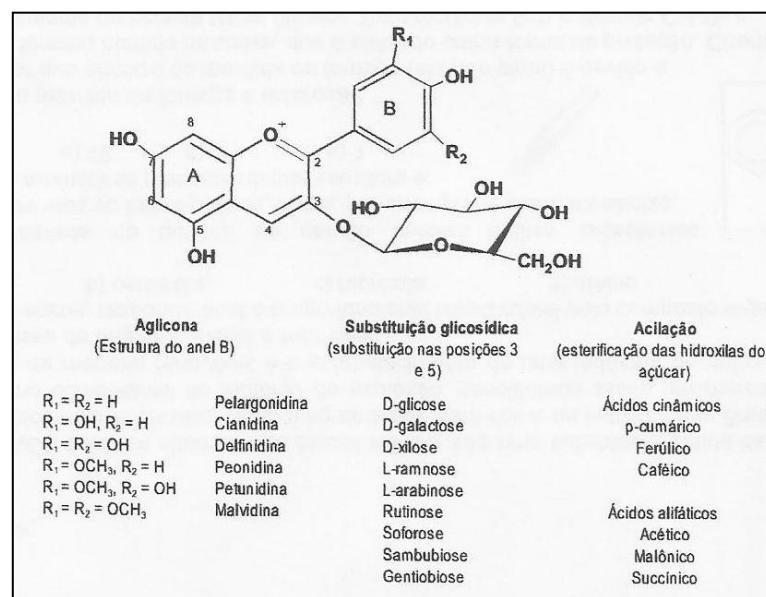
As frutas, principalmente as que apresentam a coloração na faixa do vermelho ao azul, são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares, especialmente os derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico. Dentre estes citam-se as antocianinas, os flavonóis, as catequinas e os taninos (hidrolisados ou condensados). As antocianinas são compostos fenólicos responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho, presentes em flores e frutos (ABE et al., 2007), além de atuarem como filtro das radiações ultravioletas nas folhas. Em certas espécies de plantas estes compostos estão associados com a resistência aos patógenos e na regulação da fotossíntese (MAZZA & MINIATI, 1993).



**Figura 1.4** – Estruturas básicas dos flavonóides e não flavonóides

**Fonte:** HIRSCH, 2011

As antocianinas fazem parte do grupo dos flavonóides, compostos fenólicos caracterizados pelo núcleo cátion flavílico (2-fenilbenzopirilium), que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos condensada por um oxigênio. A molécula de antocianina (Fig. 1.5) é constituída por duas ou três porções, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, freqüentemente, um grupo de ácidos orgânicos (FRANCIS, 1989). Aproximadamente 22 agliconas são conhecidas, das quais 18 ocorrem naturalmente, mas apenas seis (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) são importantes em alimentos (FRANCIS, 2000).



**Figura 1.5 – Estrutura química das antocianinas**

**Fonte:** MALACRIDA & MOTTA, 2006

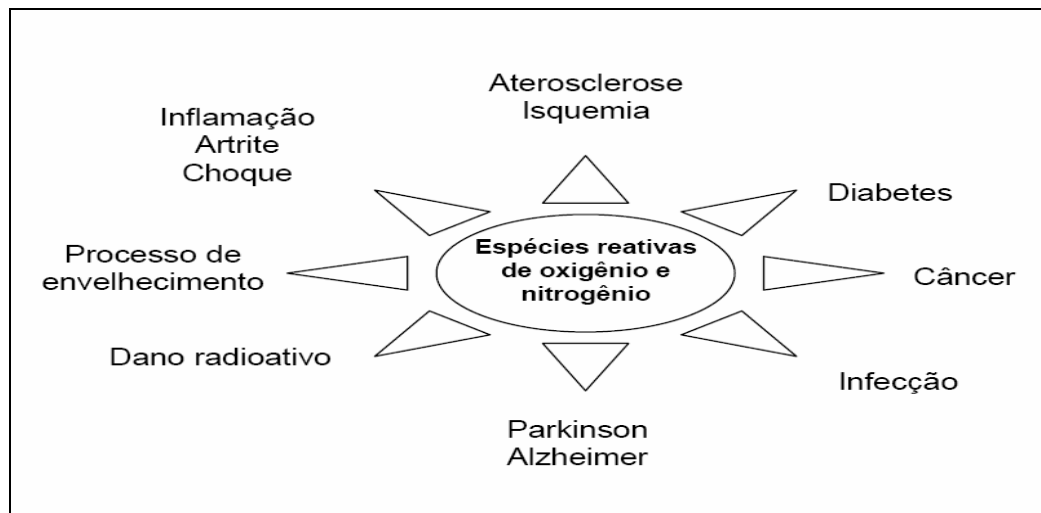
O interesse nos compostos fenólicos advém de vários estudos que sugerem que uma dieta rica em frutas, vegetais, cereais integrais e leguminosas possa trazer benefícios à saúde e diminuir o risco de doenças crônicas degenerativas (PRIOR, 2006). A importância na nutrição humana geralmente está relacionada à promoção da saúde e possível prevenção de algumas doenças (GIBNEY et al., 2006). Os efeitos bioquímicos e farmacológicos dos flavonóides são muito vastos, dentre estes se destacam as ações antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, antiplaquetária e efeitos antialérgicos. Além disso, estes compostos podem inibir enzimas, como a prostaglandina sintetase, a lipoxigenase e a ciclooxygenase, todas relacionadas diretamente com a tumorigênese. Também podem induzir a ação de enzimas do sistema desintoxicante como a glutathione transferase. Quando em alimentos, os

flavonóides agem de forma a reduzir o consumo de vitamina C, evitando a formação de radicais livres (KOO & SUHAILA, 2001).

### 1.5 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, potencialmente levando a danos, e por isto tem sido sugerido como causa do envelhecimento e de várias doenças nos seres humanos (KATALINIC et al., 2006). A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), entre outras, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN desempenham importantes funções biológicas, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor (ARAUJO, 2009). As EROs incluem todos os radicais do oxigênio, como íon superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), radical alquila ( $L^{\cdot}$ ), alcoxila ( $RO^{\cdot}$ ) e radical peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ). Nas ERNs estão incluídos além do peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), o óxido nítrico ( $^{\cdot}NO$ ) e o radical dióxido de nitrogênio ( $^{\cdot}NO_2$ ) (MANCINI-FILHO, 2006).

As EROs são, portanto, produzidas naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos que podem ser de extrema utilidade, como na ativação do sistema imunológico, da resposta inflamatória ou na detoxificação de drogas (SCHENEIDER DE OLIVEIRA, 2004). Contudo, pelo desequilíbrio entre a produção e a remoção dessas espécies, podem ocorrer vários eventos nocivos, como a apoptose de células saudáveis, o envelhecimento precoce, a alteração da função celular e o aparecimento de doenças degenerativas como aterosclerose, câncer, doença de Alzheimer ou a doença de Parkinson (FINALD, et al., 2006) (figura 1.6).



**Figura 1.6** – Patologias causadas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

**Fonte:** ARAÚJO, 2007

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (PIENIZ et al. 2009).

Os radicais livres são espécies químicas que contem um ou mais elétrons desemparelhados, o que lhes confere grande instabilidade, meia vida curta e alta reatividade química (FERREIRA et al., 2010). Essa alta reatividade química é a responsável pela instabilidade da espécie, uma vez que essas moléculas tendem a acoplarem seus elétrons não pareados com outro que esteja presente em estruturas próximas a sua formação, passando assim a comportarem-se como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons (PEREIRA & ERETTORI, 2008). Os radicais livres presentes no organismo causam dano oxidativo em diferentes tipos de moléculas, como nos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Os componentes celulares não são protegidos totalmente por antioxidantes endógenos, e está cada vez mais estabelecido que antioxidantes obtidos da dieta sejam indispensáveis para a defesa do organismo contra a oxidação e que, portanto, têm importante papel na manutenção da saúde (CERQUEIRA; et al., 2007)

O estresse oxidativo (EO) é uma das condições de dano celular mais estudada, e tem sido implicado em muitos processos patológicos (FREITAS et al 2008). O cérebro é mais vulnerável que outros tecidos ao EO, porque contém uma

grande quantidade de lipídios e metais oxidáveis, e têm em relação aos outros tecidos menos mecanismos antioxidativos (WALZ et al., 2000).

### **1.6. ATIVIDADE PROTETORA DOS ANTIOXIDANTES**

Antioxidantes são substâncias capazes de inibir a oxidação, pela redução da concentração dos radicais livres no organismo, pela quelação de íons metálicos, por impedir que o oxigênio se combine com moléculas suscetíveis ou por neutralizar espécies ativas de oxigênio, formando compostos menos reativos (GOTTLIEB et al., 2009; FERREIRA et al., 2010). Estes compostos são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos. As substâncias que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificadas como antioxidantes enzimáticos (endógenos) ou não-enzimáticos (exógenos) (SIES, 1993). O organismo conta com espécies diferentes de antioxidantes endógenos que ajudam a eliminar as espécies reativas através de mecanismos fisiológicos de defesa. Estes mecanismos são realizados através de enzimas como a glutatona redutase (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase (GSH-Px), nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADPH) e coenzima Q (JACOB, 1994); além de proteínas ligantes de metais como a albumina, metalotioneína, ceruloplasmina e transferrina (SOARES, 2002).

Dentre os antioxidantes enzimáticos, os mais estudados são as superóxido dismutases, a catalase e as glutatona peroxidases, as quais são encarregadas de reduzir peróxidos geradores de radicais  $\cdot\text{OH}$  e  $\cdot\text{OR}$  (VASCONCELOS et al., 2007). A superóxido dismutase (SOD) é a primeira linha de defesa contra as EROs por neutralizar a formação de  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  do citosol. A catalase está presente em todas as células, principalmente em peroxissomas, que usam oxigênio para converter  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio (FINALD, et al., 2006).

Em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes exógenos é de grande importância, e com isso o consumo regular de frutas e hortaliças e, alguns de seus produtos, torna-se um aliado à prevenção do risco de doenças associadas ao excesso de radicais livres no organismo. O efeito protetor atribuído às frutas deve-se à variedade de constituintes com atividade antioxidante presentes em sua composição, como vitaminas e numerosos



metabólitos secundários, incluindo os ácidos fenólicos, flavonóides e outros polifenóis (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002).

O desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende principalmente de fatores como: tipos de radicais livres formados, onde e como são gerados e doses ideais para a proteção. Assim, é possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas não proteja ou mesmo aumente as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos (HALLIWELL et al., 1995). A funcionalidade dos compostos fenólicos está relacionada principalmente à sua ação sequestradora de radicais livres, que vem sendo relacionada à presença de grupos hidroxila em sua estrutura química, fator considerado crítico para a neutralização de radicais livres (ELISIA et al., 2007). Essa neutralização é primariamente atribuída à alta reatividade dos substituintes hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) que neutralizam os radicais livres. Os compostos fenólicos, em especial os flavonóides, sequestram os radicais livres bloqueando as reações radicalares em cadeia através da doação de átomos de hidrogênio, podendo atuar em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico (DECKER, 1997).

O potencial antioxidante das antocianinas é regulado por diferenças na sua estrutura química. Variando a posição e os grupamentos químicos nos anéis aromáticos das mesmas, a capacidade de reagir com radicais livres também varia (GALVANO et al., 2004). Seu potencial antioxidante é dependente do número e da posição dos grupos hidroxilas e sua conjugação na estrutura (KUSKOSKI et al., 2004).

## **1.7 AÇÃO BIOLÓGICA DA AMORA-PRETA E DO MIRTILO**

Ramirez et al. (2005) avaliaram o efeito do mirtilo no desempenho cognitivo em ratos durante 30 dias, e concluíram que a ingestão de 3,2 mg antocianinas/kg animal/dia, proveniente de mirtilo, melhora a memória de curto prazo mas não interfere na memória de longo prazo. Araújo (2009) avaliou a ingestão diária de 5 mL de néctar de amora-preta em hamsters machos, que foram alimentados por 98 dias com dietas normo e hipercolesterolêmicas, verificando uma redução dos níveis séricos de triacilglicerídeos, colesterol total e frações colesterol-LDL, além do retardo das reações de peroxidação lipídica. Em estudo sobre o déficit cognitivo e motor provocado por irradiação, Shukitt-hala et al. (2009) concluíram que a adição de 2%

de mirtilo e 2% de morango em dietas de ratos idosos, durante 8 semanas, foi eficaz na proteção contra os efeitos nocivos desta irradiação com resultados positivos para o desempenho cognitivo e motor dos ratos. MOLAN et al. (2008) avaliou a ação do consumo diário de mirtilo no ganho de peso, em ratos alimentados por 10 semanas, obtendo como resposta a redução da ingestão alimentar entre 6% a 9% ao dia e o ganho de peso de 5% a 10% inferior aos ratos controle.

Segundo Jaakola et al. (2002), Rimando et al. (2004) e Moraes et al. (2007), os benefícios fisiológicos do mirtilo incluem redução do nível de colesterol LDL, sendo mais eficiente que muitos medicamentos prescritos pelos médicos, impedimento de infecções urinárias, melhoramento da memória e da coordenação motora afetada por doenças de caráter degenerativo.

Estudos desenvolvidos por Yugarani et al. (1992), evidenciaram uma redução marcante de colesterol total, colesterol-LDL e triacilglicerídeos no plasma de ratos hiperlipidêmicos induzidos por dieta, quando tratados com o flavonóide quercetina, composto que também está presente nos frutos de amoreira-preta. Em ratos hipercolesterolêmicos tratados com extrato de mirtilo foi observado redução sérica nos níveis de LDL-colesterol (em torno de 46%) e aumento de HDL na ordem de 10% (COFFY, 2008).

Estudo *in vitro* desenvolvido por Zhang et al. (2005) para avaliar o efeito inibitório no crescimento de células cancerígenas de diferentes linhagens, utilizando-se cinco tipos de antocianidinas (formas aglicona de antocianinas – cianidina, delphinidina, pelargonidina, petunidina e malvidina) e quatro antocianinas (cianidina-3-glicose, cianidina-3-galactose, delphinidina-3-galactose e pelargonidina-3-galactose), concluiu que na concentração de 200 mcg.mL<sup>-1</sup> a malvidina e a pelargonidina inibiram, em mais de 60%, o crescimento de células cancerígenas no estômago, cólon, pulmão e mama. Em relação às células cancerígenas no sistema nervoso central, a malvidina inibiu seu crescimento em 40,5%, e a pelargonidina em 34%. Nessa mesma concentração, a cianidina, delphinidina e petunidina inibiram o crescimento de células cancerígenas mamárias em 47, 66 e 53%, respectivamente. Ao contrário dos resultados observados para as antocianidinas, as antocianinas que não apresentaram atividade anticancerígena (ZHANG et al., 2005).

## 2.0 REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICOS

1. ABE, L. T; DA MOTA, R. V.; LAJOLO, F.; GENOVESE, M.I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. e Tecn. de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, 394-400 p., 2007.
2. ANGELO, ST, A.J. Lipid oxidation on foods. Crit. **Rev. Food Sci. Nutr.** 1996 36(3): 175-224.
3. ANTUNES LEC, DUARTE FILHO J, SOUZA CM. de. Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. **Pesq. Agrop. Brasileira**, Brasília, v.38, n.3, p.413-419, 2003.
4. ANTUNES LEC, RASEIRA MCB. Aspectos técnicos da cultura da amora-preta. Pelotas:Embrapa Clima Temperado, 2004. 54 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 122).
5. ANTUNES LEC. Amora-preta: Nova opção de cultivo no Brasil.**Cienc. Rural**. vol.32, n.1, 151-158 p, 2002.
6. ARAÚJO, P.F. **Atividade antioxidante de néctar de amora-preta (*Rubus* spp.) e sua influência sobre os lipídios séricos, glicose sanguínea e peroxidação lipídica em hamsters (*Mesocricetus auratus*) hipercolesterolêmicos.** 2009. 123f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.
7. BARREIROS LBS, DAVID JM, DAVID JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, 2006.
8. BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de Los Alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1997.
9. BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Revista de Nutrição, Campinas, v. 12, n. 2, 1999.
10. CARDOSO, R. M.; BARRÉRE, A. P.; NORONHA 1, F.; TROVÃO, C. de S. Os fitoquímicos e seus benefícios na saúde. einstein: **Educ Contin Saúde**.v.7, n.2, 106-9 p., 2009
11. CERQUEIRA MD, SOUZA-NETA L, PASSOS MGVM, LIMA EO, ROQUE NF, MARTINS D, GUEDES MLS, CRUZ FG. Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. **J Braz Chem Soc** v.18: 998-1003p, 2007

12. CHIM JF. Caracterização de compostos bioativos em amora-preta (*Rubus* sp.) e sua estabilidade no processo e armazenamento de geléias convencionais. *elight*. 2008. 86f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

13. COFFY, S.P. **Nível sérico de NO e TBA-RS em ratos Wistar submetidos à dieta hipercolesterolêmica tratados com extratos de diferentes espécies de *Vaccinium myrtillus***. 2008. 25f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Universidade regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim.

14. DE ROSSO, V.V. & MERCADANTE, A.Z.. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 55, n.22, p. 9135-3141, 2007.

15. DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v.55, n.11, 396-407 p., 1997.

16. ELISIA, I.; HU, C.; POPOVICH, D.G.; KITTS, D.D. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. **Food Chem.**, v.101, n.3, p.1052-1058, 2007.

17. EMATER/RS-ASCAR. Levantamento de preços realizado na safra 2009/2010. Vacaria, 2010b.(Dados não publicados).

18. FACHINELLO, José Carlos. Mirtilo. **Rev. Bras. Frutic.**, vol.30, n.2, 2008.

19. FERREIRA DS, ROSSO VV, MERCADANTE AZ. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.). *Rev. Bras. Frutic.*, vol.32, n.3, p. 664-674, 2010.

20. FINAUD, J; LAC, G; FILAIRE, E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. **Sports Med.** 36 (4). 2006.

21. FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.

22. FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 273-314, 1989.

23. FREITAS, R. M. et al. alterações comportamentais e neuroquímicas durante a fase aguda do processo convulsivo induzido por pilocarpina. *Revista Eletrônica de Farmácia* Vol 5(3), 60 - 70, 2008.

24. GALVANO, F.; LA FAUCI, L.; LAZZARINO, G.; FOGLIANO, V.; RITIENI, A.; CIAPPELLANO, S.; BATTISTINI, N.C.; TAVAZZI, B.; GALVANO, G. Cyanidins:

metabolism and biological properties. **J. of Nut. Biochemistry**, v.15, n.1, p.2-11, 2004.

25. GIBNEY, M. J.; MACDONALD, I. A.; ROCHE, H. M. **Nutrição e metabolismo**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

26. GOTTLIEB, M. G. V. et al. Status antioxidante, diabetes mellitus II e aterosclerose. *Revista Saúde e Pesquisa*, v.2, n. 1, p.99-106, 2009.

27. HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLINGER, J., ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v.33, n.7, 601-617 p., 1995.

28. HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v.96, p.67-202, 2002.

29. HIRSCH GE. VALOR NUTRICIONAL E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE AMORA-PRETA(*Rubus* sp.) 2011. 100f. Dissertação (mestrado)- Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS.

30. ISHIGE, K., SCHUBERT, D., SAGARA, Y., Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biological Medicine*, v.30, p.433-446, 2001.

31. JACOB, R.A. Nutrition, health and antioxidants. **Inform**, v.5, p.1271-1275, 1994.

32. KATALINIC, V. et al. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, v. 94, p. 550 – 557, 2006.

33. KING, A.R.D.; YOUNG, G.E. de D. Characteristics and occurrence of phenolics phytochemicals. **Jour. of American Dietetic Association**, v.99, n.2, p.213-218, 1999.

34. KOO, H.M.; SUHAILA, M. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **J. Agric. Food Chem. Chicago**: v.49, n. 6, p. 3106-3112, 2001.

35. KUSKOSKI, E. M. et al. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciên. e Tecn. de Alimentos**, v. 24, p. 691-693, 2004.

36. LI, H. et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines, **Food Chem.**, v. 112, p. 454–460, 2009.

37. LI, Z.H.; GEMMA. H.; IWAHORI. Stimulation of Fujiapple skin color byethephon and phosphorus-calciummixed compounds in relationto flavonoidsynthesis. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.94, p.193-199, 2002.
38. LIPP JP, CONTE A. Levantamento da fruticultura comercial do Rio Grande do Sul: 2006. PortoAlegre: EMATER/RS-ASCAR, 2007. 83 p.
39. LIU RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **J Nutr.** v.134, n.12, p.3479-3485, 2004
40. MALACRIDA, C.R. & MOTTA, S., Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade, **B.CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.
41. MANCINI-FILHO, J. Alimentos funcionais nas doenças cardiovasculares. In: COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. **Alimentos funcionais**. Viçosa: UFV, 202p., 2006.
42. MAZZA G & MINIATI E.,Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Boca Raton, CRC Press. p.362, 1993.
43. MOLAN, A.L.; LILA, M.A.; MAWSON J. Satiety in rats following blueberry extract consumption induced by appetite-suppressing mechanisms unrelated to in vitro or in vivo antioxidant capacity. **Food Chem.**, v.107, p.1039–1044, 2008.
44. MORAES JO, PERTUZATTI PB, CORRÊA FV, SALAS-MELLADO M. Estudo do mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) no processamento de produtos alimentícios. **Ciênc Tecnol Aliment**; (su pl. 27):18-22, 2007
45. MOYER, R. A., K. E. HUMMER, C. E. FINN, B. FREI E R. E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*, **J. of Agric. and Food Chem.**, Vol.50, pp.519-525, 2002.
46. NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **J. of Pharm.I and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523–1542, 2006.
47. PAGOT E. Situação e perspectivas da produção de pequenas frutas: cenárioda produção de pequenas frutas.V Simpósio Nacional do Morango e IV Encontro Sobre Pequenas Frutas eFrutas Nativas do Mercosul - Pelotas : Embrapa Clima Temperado, 2010. 70p
48. PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Vacaria, RS. Anais... Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p.9-17. (Documentos 37)

49. PAYNE, T.J. Formulating with Blueberries for Health. **Cereal Foods World**, v. 50, n. 5, p.262-264, 2005.
50. PEREIRA, T. A.; RETTORI, D. Comparação da Capacidade Antioxidante de diferentes marcas de chás verdes. In: JORNADA DE INICIACAO CIENTIFICA E TECNOLÓGICA UNIBAN, 2008, Sao Paulo. Anais... Sao Paulo: UNIBAN, p. 1-3, 2008.
51. PERTUZATTI, P.B. Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). 2009. 68f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.
52. PIENIZ, S. et al. Avaliação in vitro do potencial antioxidante de frutas e hortaliças. **Ciênc. agrotec.** vol.33, n.2, p.552-559, 2009.
53. PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. of Nat. Products**, v.63, p.1035-1042, 2000.
54. POLTRONIERI E. Alternativas para o Mercado interno de pequenas frutas. In: 1º Seminário brasileiro sobre pequenas frutas, 2003, Vacaria/RS. Anais... Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p.37-40 (Embrapa Uva e Vinho. Documento 37), 2003.
55. PRIOR RL. Phytochemicals. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. Modern nutrition in health and disease. Philadelphia: **Lippincott Williams & Wilkins**; p. 582-94. 2006.
56. RAMIRES ET al. Effect of lyophilised *Vaccinium* berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. **Pharm. Research**, v.52, n.6, p.457-462, 2005.
57. RIMANDO AM, KALT W, MAGEE JB, DEWEY J, BALLINGTON JR. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries. **J Agric Food Chem**; 52:4713-4719, 2004.
58. ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annual Review of Nutrition*, v.22, p.19-34, 2002.
59. SANTOS, A.M. dos; RASEIRA, M. do C.B. A cultura do mirtilo. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. 23 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 96.)
60. SANTOS, A.M. Situação e perspectivas do mirtilo no Brasil. In: Simpósio nacional do morango; Encontro de pequenas frutas e frutas nativas, 2004, Pelotas.

Palestras e Resumos... Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.281-284. (Documentos 124)

61. SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev. Bras Méd Esporte**, 10(4): 309-313, 2004.

62. SEERAM, N. P. Berries. HEBER, D., BLACKBURN, G., GO, V. L.W., MILNER, J. **Nutritional Oncology**, 2. ed. London: Academic Press. cap. 37, p. 615-625, 2006.

63. SEERAM, NP., ADAMS, L.S.; ZHANG, Y, LEE, R. SAND, D., Scheuller, H.S., Heber, D., Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells In Vitro. **J. of Agricultural and Food Chem.**, Washington, v.54, p.9329-9339, 2006.

64. SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **J. Agric. Food Chemistry**, Chicago: v.50, n. 8, p. 2432-2438, 2002.

65. SHARPE, R. H. Consultant's Report. Pelotas, IICA/EMBRAPA-UEPAE, p.11, 1980

66. SHUKITT-HALA et al. The Effects of Aging on Memory for Sequentially Presented Objects in Rats Behavioral Neuroscience, **American**, Vol. 123, No. 6, 1339–1345, 2009.

67. SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European J. of Biochem.**, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

68. SILVA BM. ET AL. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Fruit (Pulp, Peel and Seed) and Jam: antioxidant activity. **J. of Agric. and Food Chem.**, v. 52, n. 15, p. 4705-4712, 2004.

69. SIMIC, M.G., JAVANOVIC, S.V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: HO, C.T., OSAWA, T., HUANG, T.M., ROSEN, R.T. (Ed.). **Food phytochemicals for cancer prevention**. Washington : American Chemical Society, 1994. p.20-33. (ACS Symposium Series, n.546).

70. SLUIS, A.A. et al. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **J. Agric. Food Chem.**. Chicago: v.49, p. 3606-3613, 2001.



71. SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. de Nut.**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.
72. SOUSA, M.B.; CURADO, T.; VASCONCELLOS, F. N., TRIGO, M. J. MIRTILO – QUALIDADE PÓS-COLHEITA, **Folhas de Divulgação AGRO** 556, Nº 8, Nov 2007.
73. STONER GD. et al. Cancer prevention with freeze-dried *berries* and berry components., **Semin Cancer Biol.** v. 17, n. 5, p. 403-10; 2007.
74. STRIK, B.C. Horticultural practices of growing highbush blueberries in the ever-expanding U.S. and global scene. **J, of the Am. Pomological Society**, v.61, p.148-150, 2007.
75. TATE, P., STANNER, A., SHIELDS, K., SMITH, S., LARCOM, L., Blackberry extracts inhibit UV-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA100. **Nutr. Research**, amsterdam, v.26, p.100-104, 2006.
76. TAVARES, J. T. Q. et al. Estabilidade do ácido ascórbico em suco de laranja submetido a diferentes tratamentos. *Magistra*, Bahia, v. 12, n. 1/2, 2000.
77. TREVISAN, R. **Avaliação da qualidade de pêssegos Cv. Maciel, em função do manejo fitotécnico**. 2003. 122p. Tese (Doutorado em Ciências - Fruticultura de Clima Temperado) - Fruticultura de Clima Temperado, FAEM, UFPel.
78. VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J .B. de F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. da S. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**. v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
79. VATTEM, D.A. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. **Process Biochem**, v.40, p.1583–1592, 2005.
80. VENDRAMINI, A.L.; TRUGO, L.C. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). **J. of Brazilian Chem. Society**, v.15, n.5, p.664-668, 2004.
81. VIZZOTTO M. Metodologia científica: otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) /— Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.19p.— (Embrapa Clima Temperado. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 101).

82. WALZ, R. et al. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neur. Letters**, v. 291, p. 179-182, 2000.
83. WICKLUND T, ET AL. Antioxidant capacity and colour of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. **LWT - Lebensmittel-Wissenschaft und Techn.**, v. 38, n. 4, p. 387-391, 2005.
84. WOLFE K, WU X, LIU RH. Antioxidant activity of apple peels. **J. of Agric. and Food Chem.**, v. 53, p. 609-614, 2003.
85. YUGARANI, T.; TAN, B.K.H.; TEH, M.; DAS, N.P. Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. **Lipids**, v.27, n.3, p.265-290, 1992.
86. ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic acid in some small berries. **J. of Agric. and Food Chem.**, v.53, p.2118-2124, 2005.
87. ZHANG, Y., VAREED, S. K., NAIR, M G. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. **Life Sciences**, v. 76, n. 13, p. 1465-1472, 2005.
88. ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J. of Agric. and Food Chem.**, v.49, p. 5165-5170, 2001.

## **CAPITULO II – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA AMORA-PRETA (*Rubus fruticosus*) E MIRTILO (*Vaccinium ashei reade*) E CONTEÚDO DE FITOQUÍMICOS EM SEUS PRODUTOS LIOFILIZADOS**

### **PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF BLACKBERRY (*Rubus fruticosus*) AND BLUEBERRY (*Vaccinium ashei reade*) AND PHYTOCHEMICALS CONTENT ON ITS FREEZE-DRIED PRODUCT**

**Magna da Gloria Silva LAMEIRO<sup>1</sup>;  
Rui Carlos ZAMBAZI<sup>2</sup>; Elizabete HELBIG.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Doutoranda - Deptº de Ciência e Tecnologia Agroindustrial — FAEM/UFPel;* <sup>2</sup> *PhD- Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos/UFPel;* <sup>3</sup> *Doutora Faculdade de Nutrição/UFPel;*  
*Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900 – lameiro.  
magna@gmail.com*

#### **RESUMO**

As substâncias bioativas presentes na amora-preta e no mirtilo, como os compostos fenólicos e a vitamina C, apresentam propriedades funcionais com destaque para a atividade antioxidante e anticancerígena. Devido a pequena durabilidade pós colheita destes frutos e conseqüente instabilidade de seus constituintes, há necessidade de aplicação de um processo de conservação para manter as propriedades funcionais dos mesmos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do processamento no conteúdo de fitoquímicos em polpas concentradas, diluídas e liofilizadas de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue. Foi determinada a composição proximal das polpas “in natura” e quantificado alguns fitoquímicos por espectrometria e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando detector de fluorescência para a análise de tocoferóis e o detector de UV-Visível (UV/Vis) para os demais fitoquímicos. Comparando-se a composição das polpas “in natura” verificou-se que a polpa de mirtilo cv. Powderblue apresentou maior conteúdo energético, atividade antioxidante e maior concentração dos fitoquímicos. Os frutos submetidos à liofilização apresentaram um declínio na atividade antioxidante, aproximadamente 22,0 % na polpa da amora-preta e de 46% na polpa do mirtilo, com decréscimo no conteúdo dos compostos fenólicos em ambos os frutos. Constatou-se que não há uma uniformidade na degradação dos diferentes tocoferóis da amora-preta, sendo o  $\alpha$ -tocoferol o mais estável quando submetido à liofilização.

Palavras chave: Pequenas frutas, Antioxidantes, Cromatografia

## 1.0 INTRODUÇÃO

A busca por alimentos com alto conteúdo em compostos com ação antioxidante, somado à constante procura por alimentos de baixas calorias, proporcionou a expansão da indústria de polpas congeladas de frutas nos últimos anos<sup>33</sup>. Contudo, a atividade antioxidante do produto processado pode se apresentar diferente quando comparada à fruta “in natura”, e com isso pode alterar a efetividade de possíveis benefícios proporcionados ao organismo humano<sup>2</sup>.

Segundo a legislação Brasileira (Ministério da Agricultura), polpa de fruta é definida como um produto não fermentado, não diluído, obtido de frutos polposos, através de processo tecnológico adequado proveniente da parte comestível do fruto, devendo apresentar características próprias da fruta<sup>10</sup>. Ao mesmo tempo, devem ser obtidas de frutas sãs, não conter fragmentos das partes não comestíveis da fruta, limpas, isentas de matérias terrosas, de parasitas, de larvas e detritos de animais ou vegetais<sup>41</sup>.

Em ritmo crescente, as culturas de amora-preta e mirtilo ganham espaço dentre outras espécies, das pequenas frutas consumidas no Brasil, despertam a atenção de consumidores, processadores de frutas, agentes comercializadores e, por consequência, por produtores em escala familiar, médio e de grande porte. São fatores motivadores deste crescimento a atratividade visual, o sabor, a divulgação na mídia das propriedades nutraceuticas, a necessidade de diversificação da dieta com outras espécies de frutas e o aumento da oferta no mercado interno. A demanda do consumidor reflete-se na necessidade da contrapartida por parte das instituições de pesquisa, extensão e fomento em contribuir com informações e apoio que possam auxiliar na viabilização técnica e econômica do cultivo de pequenas fruta<sup>36</sup>. Além do fator nutricional, a conveniência é um fator limitante para os consumidores, principalmente quando relacionada à facilidade de estocagem e de preparo para o consumo doméstico<sup>22</sup>. O uso da polpa de fruta congelada está em expansão em indústrias processadoras de alimentos, como de produtos lácteos, sorvetes e de doces, o que tem aumentado o interesse de produtores e de consumidores<sup>25</sup>. A utilização de amora-preta e de mirtilo na forma de polpa congelada é uma alternativa para seu consumo<sup>21</sup>.

Em razão da produção concentrada destas pequenas frutas, que ocorre nos meses de novembro a fevereiro, e a rápida perda de qualidade pós-colheita, há uma

grande limitação quanto ao fornecimento das frutas no mercado “in natura”. Uma alternativa para o aproveitamento econômico dessas frutas consiste em sua industrialização, podendo ser congelada, enlatada, processada na forma de polpa (como matéria-prima ou aditivo de cor e sabor), ou na forma de sucos e geléias<sup>33</sup>.

Frutas como pitanga (*Eugenia uniflora* L.), butiá (*Butiá capitata*), amora-preta (*Rubus* spp.), mirtilo (*Vaccium ashei* Reade) e nêspera (*Eriobotria japonica*) são importantes fontes de fitoquímicos, principalmente de compostos fenólicos e de carotenóides. Porém, a literatura não reporta muitos dados sobre fitoquímicos presentes em frutos nativos e em pequenos frutos regionais<sup>21</sup>. A presença destes compostos, que são oriundos do metabolismo secundário, especialmente flavonóides e antocianinas, revelam grande capacidade de reagir com radicais livres que causam estresse oxidativo, e portanto, contribuem na prevenção de doenças cardiovasculares, circulatórias, neurológicas e cancerígenas. Estes compostos apresentam ainda, atividade anti-inflamatória, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana e antineoplásica<sup>25</sup>.

Os carotenóides constituem um grupo de pigmentos naturais que conferem coloração amarela, laranja ou vermelha às frutas e vegetais, e também possuem capacidade de seqüestrar os radicais livres, sendo excelentes desativadores do oxigênio singlete e alguns são precursores de vitamina A<sup>16</sup>.

O teor de compostos fenólicos em frutas varia largamente com a espécie, cultivar, local de cultivo e período do ano. Tanto a amora-preta quanto o mirtilo apresentam elevado conteúdo destes compostos quando comparados com outras pequenas frutas, os quais estão concentrados, principalmente no caso do mirtilo, essencialmente em sua película externa (epiderme). Os fenólicos polimerizados apresentam propriedades de defesa para o vegetal e são largamente distribuídos tanto entre as espécies, como em relação a sua localização dentro da fruta, sendo mais concentrados na casca do que na polpa<sup>37</sup>.

É importante salientar que as substâncias fisiologicamente ativas devem estar presentes nos alimentos com propriedades funcionais em quantidades suficientes e adequadas para produzir o efeito fisiológico desejado<sup>23</sup>. Fatores enzimáticos, químicos, físicos e microbiológicos inerentes à fruta e outros associados às condições de processamento, acondicionamento e armazenamento do produto, podem afetar a constituição físico-química, vindo contribuir para alterações na sua funcionalidade<sup>27</sup>. Pesquisas realizadas com polpa de amora-preta evidenciam que o

emprego de altas temperaturas na conservação implica, na maioria das vezes, em redução do conteúdo de compostos bioativos presentes no produto<sup>22</sup>.

Atualmente tem-se empregado tecnologias que permitem processar a fruta na forma desidratada, fazendo com que o fruto, que antes era consumido apenas em sua época de safra, hoje possa ser consumido em qualquer período do ano<sup>18</sup>.

Este estudo teve como objetivo caracterizar fisicoquimicamente a amora-preta e o mirtilo, e avaliar o efeito do processamento na estabilidade de fitoquímicos no fruto e em suas polpas diluídas e liofilizados.

## 2.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

Foram utilizados frutos de amora-preta (*Rubus fruticosus*) da cultivar cv. Tupy, e mirtilos (*Vaccinium ashei* Reade) da cv. Powderblue, ambos cultivados na cidade de Morro Redondo-RS, local que apresenta latitude de 31°35'S e longitude de 52°37'O. Os frutos foram colhidos manualmente, no período de dezembro/2009 à janeiro/2010, em seu estágio apropriado de maturação e transportados ao laboratório de cromatografia do DCTA/UFPel, sob refrigeração (0°C) em caixas de isopor, sendo então selecionados de acordo com o seu grau de sanidade. Os frutos inteiros foram imersos em água potável, após escorridos por 2 min e então acondicionados em embalagens de polietileno de alta densidade (0,45 micra) e armazenados em ultra-freezer a -80°C até o momento do processamento e das análises. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Os padrões cromatográficos para a determinação de compostos fenólicos foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO) e Fluka (Milwaukee, WI), incluindo os ácidos hidroxicinâmicos: ácido caféico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico; ácidos hidroxibenzóicos: ácido gálico, ácido elágico, ácido p-hidroxibenzóico; flavonóis: quercetina, campferol, miricetina; e os flavonóis: (+)catequina, (-)epicatequina; todos com 96-99% de pureza. Na determinação de antocianinas todos os padrões utilizados foram provenientes da Fluka (Milwaukee, WI), com pureza superior a 95%, incluindo o cloreto de cianidina, cloreto de pelargonidina, cloreto de malvidina, cloreto de peonidina, cloreto de delphinidina, cloreto de Kuromanina, cloreto de Keracianina e cloreto de malvidina-3-O-galactosídeo. Os padrões utilizados para a

determinação de tocoferóis foram:  $\alpha$ -,  $\delta$ - e  $\gamma$ - tocoferol, obtidos da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) com 90-99% de pureza . Para a determinação de carotenóides utilizaram-se padrões de  $\beta$ -cryptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina, obtidos da Chromadex (Irvine, USA); e o  $\beta$ -caroteno obtido da Fluka (Saint Louse, USA), todos com 97% de pureza. O padrão cromatográfico para a determinação de ácido ascórbico foi o ácido L-(+)-ascórbico da Synth (Diadema, Brasil), com 99% de pureza.

## **2.2 PROCESSAMENTO DAS POLPAS**

Os frutos previamente congelados ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) foram mantidos à temperatura ambiente até o descongelamento, e em seguida foram triturados em liquidificador e peneirados para obtenção da polpa.

A partir da polpa, foram obtidas as diluições com água mineral nas proporções de 50% e 75% p/v (polpa: água), recebendo as denominações:

Amora = polpa pura

Amora50% = 1 parte (500 g) de polpa + 1 parte (500 mL) de água mineral

Amora75% = 1,5 partes (750 g) de polpa + 1 parte (500 mL) de água mineral

Mirtilo = polpa pura

Mirtilo50% = 1 parte (500 g) de polpa + 1 parte (500 mL) de água mineral

Mirtilo75% = 1,5 partes (750 g) de polpa + 1 parte (500 mL) de água mineral

## **2.3 PROCESSAMENTO DOS PRODUTOS LIOFILIZADOS**

As frutas foram retiradas do ultrafreezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) e imediatamente liofilizadas, em liofilizador de bancada modelo FD 5505; após foram armazenadas em embalagens de polietileno sob congelamento ( $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) até o momento das análises.

## **2.4 AVALIAÇÕES**

As avaliações foram realizadas em frutos “in natura”, nas polpas diluídas e nos produtos liofilizados, todas as análises em triplicata.

**Umidade** – Determinada por método gravimétrico de secagem em estufa à 105°C até peso constante, sendo os resultados expressos em % de umidade, segundo método do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>.

**Proteínas** – Por meio do método de Kjeldahl, sendo os resultados expressos em % de proteína, utilizando o fator de conversão protéico de 5,75, segundo método do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>.

**Cinzas brutas** – Determinada pelo método gravimétrico, sendo os resultados expressos em % de cinzas, segundo método do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>.

**Fibra bruta** – Determinada por método gravimétrico, sendo os resultados expressos em % de fibra bruta, segundo método do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>.

**Extrato etéreo** – Através de método gravimétrico de extração por solvente (Extrator de Soxhlet), sendo os resultados expressos em % de extrato etéreo, segundo método do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>.

**Carboidratos** – Determinado por meio do cálculo de diferença centesimal dos constituintes da amostra, ou seja:  $100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ proteína} + \% \text{ extrato etéreo} + \% \text{ fibra bruta} + \% \text{ cinzas})$ , sendo os resultados expressos em % de carboidratos (RDC 360 ANVISA)<sup>10</sup>.

**Sólidos solúveis totais (SST)** – Determinado por leitura direta em refratômetro de bancada, marca Analytikjena, sendo os resultados corrigidos para a temperatura de 20°C, através de tabela de correção, e expressos em °Brix, segundo método do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>.

**Açúcares totais** – Método volumétrico (Lane-Eynon), através de titulação com solução de Fehling, sendo os resultados expressos em % de glicose, segundo método do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>.

**Açúcares redutores** – Método volumétrico (Lane-Eynon), por meio de titulação com solução de Fehling, sendo os resultados expressos em % de glicose, segundo método do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>.

**Açúcares não-redutores** – Determinado por diferença entre o teor de açúcares totais e redutores, sendo o resultado expresso em % de sacarose, segundo método do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>.

**pH** – Determinado em potenciômetro Digimed – DM-20, à temperatura de 20°C, segundo método do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>.



**Acidez total titulável** – Método volumétrico, através de titulação com NaOH 0,1N, sendo os resultados expressos em % de ácido cítrico, segundo método do Instituto Adolfo Lutz<sup>19</sup>.

**Valor Calórico** – Determinação do valor calórico total<sup>9</sup> segundo a Resolução – RDC, nº 360 de 23 de dezembro de 2003, expresso em Kcal.g<sup>-1</sup> (ANVISA)<sup>10</sup>

**Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos** – A determinação de compostos fenólicos foi realizada de acordo com método proposto por Singleton & Rossi<sup>45</sup>. Ácido gálico foi utilizado como padrão para construir a curva de calibração nas concentrações de 0,50; 100; 150; 250 e 500 mg.L<sup>-1</sup>, obtendo-se uma equação da reta expressa por  $y = 0,0131x$ , com  $r^2$ : 0,9823. O teor de fenóis totais foi expresso em mg de ácido gálico por 100 g de fruta (mg GAE.100g<sup>-1</sup>).

**Determinação de compostos fenólicos individuais** – Os compostos fenólicos foram extraídos de 5 g de polpa das frutas utilizando 30 mL de metanol acidificado, com 4,9 mL ácido clorídrico p.a, conforme método descrito por Zambiasi<sup>53</sup>. As amostras foram centrifugadas para posterior injeção no CLAE, onde foi realizado a identificação e quantificação destes compostos. O cromatógrafo consistiu no sistema CLAE-Shimadzu, com injetor automático, detector UV/Vis a 280 nm, coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (5 µm x 4,6 mm x 150 mm) com fase estacionária octadecil e uma coluna de guarda CLC-ODS com fase estacionária de superfície octadecil, ambas acondicionadas em estufa a 25°C. Utilizando-se, como fase móvel inicial, ácido acético (99:1v/v)/metanol nas proporções (100:0 v/v), por 25 minutos, alterando-se para ácido acético (99:1v/v)/metanol 60:40 (v/v) por 12 minutos, logo após 37 minutos alterando-se para ácido acético/metanol 95:05 (v/v), retornando para a fase móvel inicial após 45 minutos de análise, com fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. Os compostos fenólicos individuais foram quantificados com base da curva de calibração dos padrões externos, cujos padrões (grau espectrofotométrico) foram dissolvidos em metanol. A concentração das soluções dos padrões variou de 0,125 a 12,5 µg.25µL<sup>-1</sup> para o ácido p-cumárico ( $y = 2,14083e^{-007x}$  com  $R^2$ : 0,9904), ácido cafeico, quercetina, ácido ferúlico, epicatequina, ácido p-hidroxibenzoico, ácido gálico e ácido elágico, com as respectivas equações de reta expressa por  $y = 2,14083e^{-007x}$  com  $R^2$ : 0,9904 (ácido p-cumárico);  $y = 2,93335e^{-007x}$  com  $R^2$ : 0,9989 (ácido cafeico);  $y = 6,24982e^{-007x}$  com  $R^2$ : 0,9927 (quercetina);  $y = 3,27162e^{-007x}$ , com  $R^2$ : 0,9996 (ácido ferúlico);  $y = 1,35909e^{-006x}$  com  $R^2$ : 0,9978 (epicatequina);  $y = 6,44575e^{-007x}$  com  $R^2$ : 0,9955 (ácido p-hidroxibenzoico);  $y = 3,25519e^{-007x}$  com  $R^2$ :

0,9970 (ácido gálico);  $y = 5,8751^{e-007x}$  com  $R^2$ : 0,9977 (ácido elágico). Concentrações de 1,25 a 87,5  $\mu\text{g} \cdot 25\mu\text{L}^{-1}$  para catequina ( $y = 5,8751^{e-007x}$ , com  $R^2$ : 0,997719), e de 0,125 a 6,25  $\mu\text{g} \cdot 25\mu\text{L}^{-1}$ , para a miricetina ( $y = 1,38511^{e-007x}$ , com  $R^2$ : 0,995137) e para o kaempferol ( $y = 5,6644^{e-007x}$ , com  $R^2$ : 0,999088). Os valores dos pontos de calibração formam estipulados com base em estudos prévios de quantificação de compostos fenólicos individuais em pequenas frutas<sup>43</sup>. Os resultados foram expressos em miligramas por 100 gramas de peso da fruta “in natura”.

**Determinação do conteúdo total de antocianinas** – A determinação do conteúdo de antocianinas foi realizada seguindo método descrito por Lees & Francis<sup>26</sup>. O cálculo do conteúdo de antocianinas foi baseado na Lei de Beer (eq.1), e os resultados foram expressos em mg de cianidina 3-glicosídeo (CYD-3-G) por 100  $\text{g}^{-1}$  de amostra.

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l \text{ (eq.1)}$$

Onde: A= absorvância;  $\epsilon$ = Coeficiente de absorção molar; C= concentração mol/L e l = caminho óptico em cm.

**Determinação de antocianinas individuais** – Os compostos antociânicos foram extraídos de 10 g polpa das frutas em 20 mL de uma solução (0,1% HCl em metanol), conforme o método adaptado de Zhang et. al<sup>54</sup>. As amostras foram centrifugadas para posterior identificação e quantificação realizada através de CLAE. O sistema cromatográfico utilizado foi o mesmo descrito para a determinação de compostos fenólicos individuais, diferindo apenas no comprimento de onda do detector, que foi de 520 nm. Utilizou-se, como fase móvel inicial, ácido acético (98:2v/v)/metanol/acetonitrila nas proporções 100:0:0 (v/v/v), por 10 minutos, alterando-se para ácido acético (98:2v/v)/metanol/acetonitrila 90:0:10 (v/v/v) até atingir 15 minutos de corrida, trocando-se então para ácido acético (98:2 v/v)/metanol/acetonitrila 80:10:10 (v/v/v) em 20 minutos de corrida e para ácido acético (98:2 v/v)/metanol/acetonitrila 70:0:30 (v/v/v) em 30 minutos de corrida, retornando para a fase móvel inicial em 40 minutos de análise, com fluxo de 0,8  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . 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. A concentração das soluções dos padrões variou de 0,1 a 3,0  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  para cloreto de

peonidina, cloreto de delfinidina e para o cloreto de cianidina, com as respectivas equações de reta expressa por  $y = -1,116413e^{-015x^2} + 3,6769e^{-007x} - 0,00671422$ , com  $R^2$ : 0,999959 (peonidina),  $y = -6,76107e^{-016x^2} + 3,03932e^{-007x} - 0,00252867$ , com  $R^2$ : 0,999923 (delfinidina),  $y = 1,04234e^{-015x^2} + 1,84161e^{-007x} + 0,0230878$ , com  $R^2$ : 0,999543 (cianidina), e de 0,1 a 4,0  $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  para cloreto de kuromanina (cianidina-3-glicosídeo) ( $y = 1,60558e^{-014x^2} + 3,92608e^{-007x} + 0,0431528$ , com  $R^2$ : 0,99756); e de 0,1 a 5,0  $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ , para a keracianina (cianidina-3-rutinosídeo) ( $y = 1,643e^{-014x^2} + 2,47193e^{-007x} + 0,0926535$ , com  $R^2$ : 0,996607); e de 0,2 a 3,0  $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  para o cloreto de pelargonidina ( $y = 6,01327e^{-013x^2} + 1,78891e^{-006x} + 0,0538641$ , com  $R^2$ : 0,98959) e de 0,2 a 5,0  $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  para malvidina-3-galactosídeo ( $y = 1,76212e^{-015x^2} + 4,70402e^{-007x} + 0,0187786$ , com  $R^2$ : 0,999934). Os valores dos pontos de calibração formam estipulados com base em estudos prévios de quantificação de compostos antociânicos individuais em pequenas frutas. Os resultados foram expressos em  $\text{mg}.100\text{g}^{-1}$  de amostra.

**Determinação do conteúdo total de carotenóides** – Os carotenóides foram extraídos e quantificados conforme método proposto por Rodriguez-Amaya<sup>39</sup>. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno. $\text{g}^{-1}$  de amostra (eq.2).

$$\text{Carotenoides totais} = \frac{\text{Absorbância} \times \text{vol. do extrato (mL)} \times 10^6}{2500 \times 100 \times \text{g de amostra}} \quad (\text{eq.2})$$

**Determinação de carotenóides individuais** – A determinação de carotenóides individuais foi realizada segundo o método descrito por Rodriguez-Amaya<sup>39</sup>. Após a etapa de extração foi realizada a saponificação com 25 mL de KOH em etanol 1,5 N a frio (Zambiasi, 1997). A análise por cromatografia líquida de alta eficiência consistiu no sistema descrito para a análise de compostos fenólicos individuais, equipado com detector UV/Vis, utilizando o comprimento de onda de 450 nm. A separação foi efetuada utilizando um sistema de eluição como fase móvel inicial de metanol / acetonitrila / acetato de etila nas proporções 30:70:0 (v/v/v), por 10 minutos, alterando-se para metanol / acetonitrila / acetato de etila 10:80:10 (v/v/v) até atingir 35 minutos de corrida, logo após, alterando-se para metanol / acetonitrila / acetato de etila 5:80:15 (v/v/v), retornando para a fase móvel inicial em 40 minutos de análise, com fluxo de 1  $\text{mL}.\text{min}^{-1}$ . A concentração das soluções dos padrões variou de 0,001 a 0,8  $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  para luteína ( $y = 6,916e^{-016x^2} + 4,794339e^{-008x}$ , com  $R^2$ : 0,995467); de 1,005 a 50,25  $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  para  $\beta$ -criptoxantina ( $y = -5,82985e^{-012x^2} + 7,79436e^{-005x}$ , com  $R^2$ : 0,99977); de 0,1 a 2,0  $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  para o licopeno ( $y = 8,77858e^{-012x^2} + 1,116413e^{-007x} - 0,00671422$ , com  $R^2$ : 0,999959).

$016^{x^2} + 2,26943^{e-007x}$ , com  $R^2$ : 0,997093); e de 0,005 a  $1,0 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  para o  $\beta$ -caroteno ( $y = 2,83165^{e-016x^2} + 4,4075^{e-008x}$ , com  $R^2$ : 0,998344). Os valores dos pontos de calibração formam estipulados com base em estudos prévios de quantificação de carotenóides individuais em pequenas frutas. O conteúdo de carotenóides foi expresso em  $\mu\text{g}$  carotenóide por  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra.

**Determinação do conteúdo de tocoferóis** – A extração de tocoferóis foi realizada de acordo com o método proposto por Zambiasi<sup>53</sup>. O sistema cromatográfico utilizado foi o mesmo descrito para a determinação de compostos fenólicos individuais. Utilizou-se, como fase móvel inicial, metanol /acetonitrila/isopropanol nas proporções 40:50:10 (v/v/v), por 10 minutos, alterando-se para metanol/acetonitrila/isopropanol 65:30:5 (v/v/v) até atingir 12 minutos, retornando para a fase móvel inicial até 15 minutos de análise, com fluxo de  $1 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$ . Utilizou-se o detector de fluorescência RF-10A<sub>XL</sub> em comprimento de onda de 290 nm para excitação e de 330 nm para a detecção. A quantificação de  $\beta$ -tocoferol foi realizada baseada na curva de calibração do  $\delta$ -tocoferol, porque estes dois compostos não são separados no processo cromatográfico, e portanto, são quantificados conjuntamente. Para a elaboração da curva padrão de  $\alpha$ -tocoferol, utilizaram-se concentrações de 0,156; 0,312; 0,625; 1,250; 2,500; 5,000; e 7,000  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  ( $y = 375755 + 76067628^x$ ,  $R^2$ : 0,9979); para o  $\gamma$ -tocoferol utilizaram-se concentrações que variaram de 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,250; 2,500; e de 5,000  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  ( $y = -553002 + 348445746^x$ ,  $R^2$ : 0,9932); e para o  $\delta$ -tocoferol utilizaram-se soluções de concentrações de 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,250; 2,500; e de 5,000  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  ( $y = -77585 + 267516328^x$ ,  $R^2$ : 0,9956). Os dados foram expressos em  $\mu\text{g}.$   $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra.

**Determinação do conteúdo de Ácido L-ascórbico** – A determinação de ácido ascórbico foi realizada por HPLC, de acordo com Vinci et. al<sup>50</sup>. O sistema cromatográfico utilizado foi o mesmo descrito para a determinação de compostos fenólicos individuais. Utilizou-se a fase móvel com eluição isocrática, composta por solução de ácido acético (0,1% em água ultra pura) e metanol, na proporção de 98:2 v/v, com fluxo de  $0,8 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$ . Utilizou-se o detector espectrofotométrico UV/Vis em comprimento de onda de 254nm. Para realizar a quantificação de ácido L-ascórbico utilizou-se a curva de padrão de ácido L-ascórbico com 0,1; 0,5; 1,0; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10  $\text{mg}.$   $100 \text{ mL}^{-1}$  obtendo-se uma equação da reta expressa por  $y = 9,109367e^{-}$

$0.015x^2 + 2.3401e^{-0.007x}$ , com  $R^2$ : 0,996175. O conteúdo de ácido L-ascórbico foi expresso em  $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de amostra.

**Atividade antioxidante**— A atividade antioxidante foi determinada seguindo o método descrito por Brand-Willians et al.<sup>8</sup>, com alterações. Para a extração dos compostos com atividade antioxidante empregou-se metanol, e a amostra foi homogeneizada usando um Ultra-Turrax em velocidade máxima. Após maceração de 24 horas à uma temperatura de 3-4°C a amostra foi centrifugada. Foi preparada uma solução de 2,2-difenil-1-picrylhidrazil (DPPH) pesando-se 24 mg do radical livre DPPH e dissolvendo em 100 mL de metanol, após esta foi estocada a 4°C. No momento da análise, retirou-se 10 mL desta solução, 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  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra foram adicionados a 3,9 mL da solução uso de DPPH, com a finalidade de completar o volume a 4 mL. A absorbância da amostra foi lida em espectrofotômetro após 24 horas em comprimento de onda de 517 nm. A atividade seqüestrante de radicais livres foi determinada pela comparação com uma curva padrão de Trolox-DPPH, que variou entre 0,10 a 5 mM ( $y = 0,508x$ ;  $R^2$ : 0,997). Os resultados foram expressos  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox. $\text{g}^{-1}$  de amostra.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das avaliações foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA), teste F e teste de Tukey, com nível de significância de 5% para comparação das médias, através do programa STATISTICA versão 7.0<sup>47</sup>.

## 3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 DETERMINAÇÕES FÍSICO QUÍMICAS DE AMORA-PRETA CV. TUPY E DE MIRTILO CV. POWDERBLUE

Os resultados da composição físico-química dos frutos de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue encontram-se descritos na tabela 2.1.

No momento da colheita, a faixa ideal de acidez total para as frutas deve estar entre 0,3 e 1,3% de ácido cítrico, o pH em torno de  $3,75 \pm 0,5$  e o teor de SST acima de 10%<sup>15</sup>. Tanto a amora quanto o mirtilo apresentam valores dentro das faixas propostas na literatura. A amora preta apresentou-se como um fruto mais ácido que o mirtilo, caracterizada por uma acidez de 1,15% em ácido cítrico. O pH da fruta “in natura” é importante na retenção de antocianinas, uma vez que em pH inferior a 3,0 estes componentes são mais estáveis frente a fatores que aceleram sua decomposição<sup>28</sup>. As cultivares em estudo têm valores de pH próximos a 3,0 e portanto, são mais propícias para a manutenção dos compostos bioativos. As mesmas variações foram observadas em relação à polpa de amora-preta cv. Cherokee, avaliada por Nachtigall et al.<sup>34</sup>, quanto aos valores de pH (3,07), acidez (1,22%) e SST (7,8°Brix). Mota<sup>33</sup> em polpa de amora-preta cv. Tupy, safra 2003/2004, determinou valores de 6,93 °Brix, e de 3,2 e 1,33%, respectivamente para pH e acidez. Raseira & Antunes<sup>38</sup> caracterizam o teor de SST, como sendo de 10,5 a 12,8 °Brix para a amora-preta cultivar Bluegem da região de Pelotas-RS.

O conteúdo de umidade das polpas de amora e de mirtilo diferiram significativamente entre si. O percentual na polpa de amora-preta cv. Tupy ficou na faixa de 92,27%, resultado semelhante também foi encontrado por Araújo<sup>2</sup> (91,38%), e menor percentual foi encontrado em fruta da mesma cultivar por Chim<sup>12</sup> (88%). O conteúdo de umidade do mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) está na faixa de 86,72%; semelhante ao encontrado por Silveira et al.<sup>44</sup> (87,68%).

A relação entre sólidos solúveis e acidez total foi de 6,95 para amora-preta e de 12,37 para o mirtilo; valor menor do que determinado por Granada<sup>17</sup>, que encontrou valores médios de 8,00 para a amora preta cultivar Tupy.

Os demais parâmetros avaliados, proteínas e extrato etéreo, não diferiam significativamente para essas duas cultivares. As frutas regionais, como morango, mirtilo e framboesa, apresentam baixos teores de proteínas e de gordura (em torno de 0,80 e 0,15% respectivamente, em base úmida)<sup>1</sup>. Percentuais um pouco superiores de proteínas foram encontrados nesse estudo para a amora-preta, e de gordura no mirtilo e na amora-preta. Outros parâmetros físico-químicos avaliados apresentaram diferença significativa. Os teores de fibra bruta de amora assemelharam-se aos valores descritos por Araújo et al.<sup>4</sup>, para polpa de amora-preta cv. Tupy, safra 2007/2008. O autor relatou teor de fibra bruta em torno de 3,71% e de cinzas de 3,02% (base seca). O menor valor encontrado neste estudo

para cinzas e fibras, pode ser atribuído à operação de despulpamento, onde as cascas e as sementes foram totalmente removidas. Os valores de fibra bruta encontrados nesse estudo oscilaram entre 0,28% (amora-preta) e 1,08% (mirtilo). Resultado semelhante foi encontrado por Silveira et. al.<sup>44</sup> para o conteúdo de fibra bruta em mirtilo (1,69%), ambos determinados em base úmida. O valor de cinzas no extrato de mirtilo foi de 0,15%, semelhante ao identificado por Silveira et al. (0,19%)<sup>44</sup>. O teor de cinzas pode ser considerado como uma medida geral de qualidade nos alimentos, uma vez que maiores teores de cinzas retratam também maiores teores de cálcio, magnésio, ferro, fósforo, sódio e outros componentes minerais nos frutos<sup>52</sup>.

A polpa de amora-preta estudada por Araújo<sup>2</sup> apresentou menores teores de açúcares totais, redutores e não-redutores quando comparada à polpa deste estudo. Moraes et. al.<sup>32</sup> trabalhando com diferentes cultivares de mirtilo, encontraram valores semelhantes na cultivar Delite para o conteúdo de açúcares totais (35,0%) e de açúcares redutores (15,4%).

### **3.2 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS NAS POLPAS, POLPAS DILUÍDAS E NOS PRODUTOS LIOFILIZADOS**

O teor de umidade na amora-preta liofilizada foi de 14,21% e no mirtilo liofilizado de 8,19%. A determinação de umidade é uma das medidas mais importantes e utilizadas na análise de alimentos<sup>33</sup>, pois o conteúdo de água está relacionado com sua estabilidade, qualidade e composição, e pode afetar o produto durante o armazenamento, processamento e consumo<sup>11</sup>.

Quando comparado com os valores das respectivas polpas, ocorreu pequeno decréscimo no valor do pH e confirmado por um pequeno aumento significativo no teor de acidez nos produtos liofilizados da amora-preta. Comportamento semelhante foi encontrado por Oliveira et. al.<sup>35</sup> no estudo com polpa de uvaia. Isto ocorre pela redução do conteúdo de água e respectiva concentração dos compostos nos produtos liofilizados. Observa-se também, um decréscimo nos teores de acidez e um aumento no valor do pH, à medida que aumenta o grau de diluição das amostras de ambos os frutos (Tabela 2.2).

Pode-se observar um decréscimo significativo no teor de antocianinas e de compostos fenólicos, tanto na amora quanto no mirtilo, à medida que ocorre a

diluição da polpa, conforme a tabela 2.2. Evidencia-se, portanto, que uma mistura de diferentes compostos fenólicos com polaridade diversificada encontram-se nas polpas destas frutas, sendo a maior proporção destes constituintes solúveis em água<sup>30</sup>.

De acordo com Costa et al.<sup>14</sup>, em estudos com polpa de acerola, foi observado que o processo de liofilização apresenta algumas vantagens em relação a outros métodos de conservação, como na manutenção da estrutura original do produto e do valor nutricional, além da preservação das características sensoriais. No presente estudo, os frutos liofilizados apresentaram apenas uma pequena redução, quando comparada a suas polpas, no teor de antocianinas, de 12,79% na amora-preta e de 11,01% no mirtilo. Perdas pouco superiores foram observadas em relação ao conteúdo de compostos fenólicos, de 14,91% na amora-preta e de 30,94% no mirtilo. Portanto, as antocianinas demonstraram maior estabilidade do que o total de compostos fenólicos durante o processo de liofilização.

Ferreira<sup>16</sup>, ao analisar amora-preta (*Rubus* spp.) “in natura”, encontrou valores de 90,5 mg de CYD-3-G.100g<sup>-1</sup> para antocianinas e de 241,7 mg de AG.100g<sup>-1</sup> de compostos fenólicos; enquanto estudos de Rutz et. al.<sup>40</sup> em amora cv Tupy, quantificaram valores inferiores para fenóis totais (161,17 mg de AG.100g<sup>-1</sup>). Pertuzatti<sup>37</sup>, no estudo da polpa de mirtilo da cv. Powderblue, relata teores de 215,40 mg de AG.100g<sup>-1</sup> de compostos fenólicos. Kalt et. al.<sup>24</sup>, constata para o mirtilo cv *highbush* e *lowbush* conteúdos de compostos fenólicos de 227,0 a 277,0 mg de AG.100g<sup>-1</sup>.

### 3.3 CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS

A cromatografia líquida de alta eficiência é o método mais utilizado para a detecção, identificação e quantificação de flavonóides, ácidos fenólicos e seus derivados<sup>46</sup>. Neste método, a amostra é aplicada e eluída através da coluna cromatográfica, sob condições específicas, designadas para uma separação e resolução eficientes. Existem vários sistemas cromatográficos publicados para a separação de flavonóides e ácidos fenólicos. Os principais métodos cromatográficos utilizam cromatografia de fase reversa, com coluna C<sub>18</sub> equipada com uma pré-coluna correspondente<sup>46</sup>.



Pelos cromatogramas típicos de separação dos ácidos fenólicos e flavonóis presentes em cultivares de amora-preta e mirtilo, obtidos na separação cromatográfica, observa-se a presença de 6 picos distintos, na cultivar de amora-preta (Figura 2.1) e 5 picos distintos na amostra de mirtilo, referente aos compostos fenólicos (Figura 2.2).

O procedimento de separação e quantificação dos compostos fenólicos foi estabelecida a partir de testes de extração e condições cromatográficas preliminares realizados por Chim<sup>12</sup>, utilizando como base, o método descrito por Zambiasi<sup>53</sup>. No presente estudo eliminou-se a adição da água no processo de extração, utilizando-se apenas metanol acidificado com ácido clorídrico 6 M. Assim foi otimizado o tempo de evaporação em 30 minutos no rota evaporador (40°C), durante o processo de extração dos compostos fenólicos das amostras, ocasionando menor probabilidade de perdas no seu conteúdo.

Os dados de quantificação de compostos fenólicos individuais em cultivares de amora-preta e de mirtilos são ainda pouco explorados. Estudos de Sellappan et al.<sup>42</sup> analisando cultivares de amora-preta Choctaw e Kiowa, reportaram os ácidos gálico e o ácido caféico como os ácidos majoritários, com 6,42 a 4,12 mg.100g<sup>-1</sup> e 1,38 a 3,64 mg.100g<sup>-1</sup>, respectivamente. Porém, segundo os autores, as amostras não passaram por uma hidrólise ácida durante o processo de extração, o que pode ter ocasionado uma extração ineficiente, apresentando uma quantidade de picos, relativos aos diferentes compostos fenólicos, bem inferiores ao encontrado no presente estudo.

Os ácidos fenólicos majoritários identificados na polpa de amora-preta cv. Tupy foi o ácido hidroxibenzóico (101,47 mg.100g<sup>-1</sup>) e na polpa de mirtilo cv Powderblue o ácido gálico (119,16 mg .100g<sup>-1</sup>).

O ácido gálico tem sido o principal ácido fenólico encontrado no mirtilo, atingindo 50% do total de compostos fenólicos da cultivar Powderblue<sup>36</sup>, resultado semelhante foi verificado nesse estudo, onde o ácido gálico, representou 49,61% do total de compostos fenólicos do mirtilo.

De acordo com Jacques<sup>20</sup>, além de ácido gálico foram identificados na amora-preta a quercetina, epicatequina e os ácidos caféico, ferúlico e o hidroxibenzóico. No presente estudo foram identificados os mesmos compostos na amora-preta, com exceção da quercetina e da epicatequina.

Como esperado, observa-se uma redução significativa no conteúdo dos compostos fenólicos, à medida que ocorreu a diluição das polpas (Tabela 2.3).

Observou-se a redução do conteúdo de compostos fenólicos com a diluição da polpa, sendo mais evidenciado com o conteúdo de quercetina, o que pode estar relacionado com sua menor solubilidade em água<sup>7</sup>.

### 3.4 CONTEÚDO DE ANTOCIANINAS INDIVIDUAIS

Tem sido encontrado uma ampla variedade de antocianinas e de antocianidinas em pequenas frutas. Segundo Ferreira<sup>16</sup>, as antocianinas identificadas em amora-preta (*Rubus spp.*) cultivar Tupy foram cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-dioxalil-glucosídeo, cianidina-3-malonil-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo, sendo a primeira a em maior quantidade ( $104,1 \pm 1,7$  mg.100g<sup>-1</sup> de fruta), correspondendo a aproximadamente 92,7% do total das antocianinas.

No presente estudo foi identificado apenas um único tipo de antocianina para amora-preta (Figura 2.3), cianidina-3-rutinosídeo, que totalizou 99,24% (Tabela 2.4) das antocianinas totais ( $141,02 \pm 1,3$  mg.100g<sup>-1</sup> de fruta) (Tabela 2.2). O mesmo comportamento foi observado por Stintzing et. al.<sup>48</sup> identificaram a cianidina 3-glucosídeo como o pigmento mais importante em todas as amostras de amora analisados com um nível médio de 82,9% do total de antocianinas identificadas.

No mirtilo cv. Powderblue não foi possível a separação completa das antocianinas: Keracinina e Kuromanina, por apresentarem estrutura química muito similar, diferindo apenas no açúcar glicosilado na antocianina, cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-glicosídeo, respectivamente, apresentaram tempos de retenção muito similares (Figura 2.4).

Estudos com a casca, polpa e fruto inteiro de diferentes cultivares de mirtilo, não identificaram antocianinas na polpa da cultivar Powderblue. No entanto, a Keracinina foi identificada na polpa da cultivar Delite, mesmo que em quantidades muito pequenas ( $0,07$  mg.100g<sup>-1</sup> fruta fresca)<sup>37</sup>. Neste estudo, analisando o fruto inteiro, foram identificadas a malvidina, kuromanina, keracinina e perlagonidina (Tabela 2.4).

### 3.5 CONTEÚDO TOTAL DE CAROTENÓIDES

O conteúdo de carotenóides nas polpas, polpas diluídas e nos produtos liofilizados de amora-preta e mirtilo utilizados neste estudo estão apresentados na tabela 2.5.

Observou-se diferença significativa no conteúdo de carotenóides na polpa “in natura” e nos liofilizados de ambos os frutos. Tanto na amora quanto no mirtilo ocorreram perdas expressivas destes pigmentos no processo de liofilização, atingindo na amora uma redução de 65,81% e no mirtilo perdas de 56,43%.

Estudos de Jacques et. al.<sup>21</sup> com amora-preta cv. Tupy reportam um conteúdo de carotenóides totais de 0,59 mg de  $\beta$ -caroteno.100g<sup>-1</sup> de fruta; e de Marinova & Ribarova<sup>29</sup> conteúdos de 0,44 mg de  $\beta$ -caroteno.100g<sup>-1</sup> de fruta, ambos superiores ao encontrado neste estudo para a polpa “in natura”.

Pertuzatti<sup>37</sup>, ao avaliar carotenóides em mirtilo, constatou que este fruto apresenta baixo conteúdo deste pigmento (0,66 a 0,16  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno.g<sup>-1</sup>), o que é corroborado por dados expostos por Jacques et al.<sup>21</sup>, que ao analisarem diversas frutas constataram que o mirtilo foi a que apresentou os menores teores de carotenoides (1,4  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno.g<sup>-1</sup> fruta fresca). Frutos cujos principais compostos presentes pertencem à classe das antocianinas, o conteúdo de carotenóides é reduzido durante o amadurecimento, em decorrência disto, frutos como o mirtilo possuem pequenas quantidades de carotenóides<sup>28</sup>. No entanto, na casca de cultivares como Briteblue e Bluebelle, os teores são mais expressivos, podendo ser comparados com o conteúdo em frutos como o butiá (28  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno.g<sup>-1</sup>fruta fresca) e nespera (24  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno.g<sup>-1</sup> fruta fresca)<sup>21</sup> que apresentam os carotenóides como seus pigmentos majoritários.

### 3.6 CONTEÚDO DE CAROTENÓIDES INDIVIDUAIS

Estudos de Jacques<sup>20</sup> relatam que colunas de fase reversa C<sub>18</sub> e C<sub>30</sub> vêm sendo amplamente utilizadas para separação de carotenóides, porém, em coluna C<sub>18</sub> não ocorre a separação de isômeros geométricos (cis-trans) de carotenóides apolares, como a luteína e a zeaxantina. Nos produtos liofilizados, na polpa e na polpa diluída de amora-preta cv. Tupy foram identificados os carotenóides  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, zeaxantina e  $\beta$ -caroteno. (Figura 2.5).

Observa-se que o processo de liofilização afetou significativamente o conteúdo dos carotenóides na amora-preta, atingindo perdas de 13,14% (Tabela 2.6). No entanto, relacionando aos processos tradicionais, a liofilização ainda provoca menores perdas no teor total de carotenóides da amora-preta. Jacques<sup>20</sup> em seu estudo de armazenamento de amora-preta a baixa temperatura observou perdas de até 80% no conteúdo de carotenoides, durante o período de armazenamento da polpa por 6 meses nas temperaturas de -10 e -18 °C, demonstrando a alta sensibilidade destes pigmentos ao armazenamento congelado.

A estabilidade dos carotenóides difere muito nos alimentos, mesmo quando submetidos a processamento e condições de estocagem idênticas<sup>22</sup>. A principal causa de destruição dos carotenóides é devida a sua oxidação, tanto em via enzimática quanto não enzimática.

Na separação cromatográfica dos carotenóides no mirtilo foi possível a identificação de três picos (Figura 2.6), assim como na amora preta. O  $\beta$ -caroteno foi o carotenóide majoritário, em ambas cultivares, sendo o carotenóide mais estável a liofilização (Tabela 2.6). Costa et. al.<sup>14</sup> encontraram na polpa de acerola, uma maior instabilidade da  $\beta$ -criptoxantina em relação ao  $\beta$ -caroteno, comportamento oposto foi encontrado nas cultivares em estudo.

### 3.7 CONTEÚDO DE TOCOFERÓIS

O delta ( $\delta$ -) e o alfa ( $\alpha$ -) tocoferol apresentaram separação bem definida, com alta resolução, em coluna de fase reversa (fase estacionária apolar), porém, utilizando-se destas condições cromatográficas, o beta ( $\beta$ -) e o gama ( $\gamma$ -) tocoferol não foram separados, sendo então quantificados conjuntamente. Com isto, foi possível a identificação de três picos para a amora-preta (Figura 2.7) e um pico para o mirtilo (Figura 2.8).

A amora cv. Tupy apresentou um teor significativamente superior de tocoferóis ( $9,74 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) ao conteúdo presente no mirtilo ( $0,75 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) (Tabela 2.7). A fração delta ( $\Delta$ ) tocoferol foi identificada em menor quantidade na amora-preta e não foi quantificada no mirtilo. Barcia et al.<sup>6</sup> também relatam em amora cv. Tupy teores superiores de tocoferóis ( $8,25 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) quando comparada ao mirtilo cv. Woodard ( $5,35 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), jambolão ( $5,34 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), pêssago cv. Eldorado ( $2,91 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), araçá roxo ( $1,43 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e no physalis ( $1,48 \mu\text{g.g}^{-1}$ ).

O teor total de tocoferóis reduziu significativamente, comparando suas polpas concentradas, polpas diluídas e produtos liofilizados de ambas as frutas. Comportamento diferenciado ocorreu entre suas diluições, as quais apresentaram conteúdos similares nas polpas com as diferentes diluições.

Os tocoferóis são encontrados expressivamente em produtos com alto teor em gordura, como amêndoas, óleos vegetais e em algumas frutas e vegetais. No entanto, na avaliação do conteúdo de tocoferóis nos frutos de amora-preta, araçá roxo, butiá, jambolão, mirtilo, nêspira, pêra, pitanga e pêssegos, estudos concluíram que a amora-preta e o mirtilo foram os frutos que apresentaram maior conteúdo em tocoferóis<sup>6,13</sup>.

Chun et al.<sup>13</sup> relatam conteúdos de tocoferóis mais de duas vezes superiores ( $37,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) aos encontrados no presente estudo ( $16,251 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). Pertuzatti<sup>37</sup> relata conteúdos de  $0,09 \text{ mg.}100\text{g}^{-1}$  de tocoferóis em cultivares de mirtilo, Climax e Powderblue, conteúdo similar ao encontrado no presente estudo ( $0,075 \text{ mg.}100\text{g}^{-1}$ ).

Jacques<sup>20</sup> relata que temperaturas de  $-10$  e  $-18^{\circ}\text{C}$  não são eficientes para preservação de tocoferóis na amora-preta. Mesmo a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , os tocoferóis foram degradados a partir dos dois meses de armazenamento.

### 3.8 CONTEÚDO DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO

Foi observada boa resolução para o ácido L-ascórbico em polpas de amora-preta cv. Tupy e mirtilo cv. Powderblue (Figuras 2. 9 e 2.10), quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna de fase reversa revestida com octadecil.

O mirtilo cv. Powderblue demonstrou ser um fruto mais rico em ácido L-ascórbico que a amora-preta cv. Tupy (Tabela 2.8). Atala et al.<sup>5</sup> relata conteúdos de  $8 \text{ mg.}100\text{g}^{-1}$  para o mirtilo e de  $6 \text{ mg.}100\text{g}^{-1}$  para a amora-preta. Valores um pouco inferiores de ácido L-ascórbico na amora-preta cv. Tupy foi encontrado por Chim<sup>12</sup> ( $2,4 \text{ mg.}100 \text{ g}^{-1}$ ), estando mais próximos ao encontrado neste estudo.

Após o processo de liofilização observou-se pequena redução no conteúdo de vitamina C na polpa de amora-preta de 14% e na polpa de mirtilo em 18,61%. Estes dados concordam com Oliveira et. al.<sup>35</sup> os quais enfatizam que o processo de liofilização preserva em grande parte as características originais do produto “in natura”, destacando-se o teor de vitamina C.

Menezes et. al.<sup>31</sup> constataram redução de 33,47% no conteúdo de vitamina C para o pó liofilizado, enquanto no processo de secagem a seco em estufa foi verificado um declínio de 49,52%, no estudo com polpa de acerola.

### 3.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do fruto reflete a capacidade antiradical apresentada, expressa em  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox. $\text{g}^{-1}$ , após todos os antiradicais encontrados no extrato terem reagido com o radical estável DPPH<sup>51</sup>.

Os resultados das determinações da atividade antioxidante da polpa liofilizada, da polpa e da polpa diluída de amora-preta cv. Tupy e do mirtilo cv. Powderblue estão demonstrados na Tabela 2.9.

Observa-se que o mirtilo apresentou maior capacidade antioxidante que a amora-preta, coincidindo com o maior conteúdo de fitoquímicos do mirtilo. A correlação entre a atividade antioxidante (TEAC), o conteúdo de antocianinas e o conteúdo total de compostos fenólicos nos frutos estudados (amora-preta e mirtilo) estão representados nas figuras 2.11 e 2.12. A média dos valores de TEAC se correlaciona de forma positiva com a média dos valores de compostos fenólicos e de antocianinas. Para polpa de amora-preta cv. Tupy observou-se a correlação de  $r^2$ : 0,993 ( $P < 0,01$ ) com o conteúdo total de compostos fenólicos e de  $r^2$ : 0,970 para o conteúdo total de antocianinas ( $P < 0,01$ ) (Figura 2.11). Para a polpa de mirtilo cv. Powderblue foi observado com o conteúdo total de fenóis  $r^2$ : 0,995 ( $P < 0,01$ ) e com o conteúdo total de antocianinas  $r^2$ : 0,926 ( $P < 0,01$ ) (Figura 2.12).

Os compostos fenólicos são considerados os principais responsáveis pela atividade antioxidante em frutos<sup>20</sup>, apesar de o ácido ascórbico ter papel relevante no estresse oxidativo. Sun et. al.<sup>49</sup> demonstraram que a contribuição da vitamina C na determinação da atividade antioxidante de 11 (onze) frutos é baixa e afirmaram que a maior contribuição para a atividade antioxidante de frutos se deve à composição de compostos fenólicos. Kuskoski et. al.<sup>25</sup> observaram a influência majoritária dos compostos fenólicos na atividade antioxidante e, principalmente, a dos pigmentos antociânicos, em polpas de frutas como o abacaxi, a graviola, o cupuaçu e o maracujá. Pertuzatti<sup>44</sup> constatou uma correção expressiva entre o conteúdo total de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante ( $r^2$ : 0,997) em

relação ao conteúdo de outros fitoquímicos, concordando com os dados deste estudo.

De acordo com Kuskoski et. al.<sup>25</sup> a relação direta de cada grupo de compostos ou dos compostos fenólicos individuais, deve ser estabelecida através de estudo específico com os compostos isolados, assim como para se determinar as quantidades diárias necessárias e ideais de antioxidantes na alimentação equilibrada, levando em consideração diversas variáveis e condições de vida de cada indivíduo.

Neste estudo, as polpas mantiveram suas propriedades antioxidantes, mas apresentaram um declínio desta propriedade após a liofilização.

A capacidade antioxidante de ambos os frutos foi afetada pelo processo de liofilização, apresentando diferença significativa dos demais tratamentos, ao nível de 5%. A polpa de amora-preta liofilizada apresentou uma redução de 21,49% na atividade antioxidante, em relação a sua polpa “in natura”. No entanto, a redução da atividade antioxidante foi mais evidente nas polpas do mirtilo liofilizado quando comparado com a polpa “in natura”, atingindo redução de 50,51%.

#### 4.0 CONCLUSÕES

O mirtilo cv. Powderblue apresenta maior conteúdo energético que a amora-preta cv. Tupy, evidenciado pelo maior conteúdo de carboidratos, além de conter o maior conteúdo de fibras brutas.

Pelo estudo comparativo das duas berries, verificou-se que a polpa “in natura” de mirtilo cv. Powderblue apresenta maior capacidade antioxidante que a amora-preta cv. Tupy, coincidindo com sua maior concentração em fitoquímicos quantificados.

Os frutos submetidos à liofilização apresentaram um declínio na sua capacidade antioxidante de aproximadamente 21,49% na polpa de amora-preta e de 50,51% na polpa do mirtilo, coincidindo com o decréscimo do conteúdo dos compostos fenólicos. Constatou-se que não há uma uniformidade na degradação nas frações de tocoferóis da amora-preta, sendo a fração de  $\alpha$ -tocoferol, a mais estável quando submetida à liofilização.

## ABSTRACT

The blackberry and blueberry bioactive compounds, such as phenolic compounds and vitamin C, have functional properties such as antioxidant and anticancer activity. Because a short shelf life and consequent instability of these compounds, there is a need to apply a conservation process to keep its functional properties. The aim of this study was to evaluate the effect of processing on the phytochemicals stability of blackberry cv. Tupy and blueberry cv. Powderblue concentrated and diluted pulps and in freezing drying products. It was determined the proximal composition of the in nature fruit and quantified the total (spectrometry) and individual (HPLC) phenolic compounds using fluorescence detection for tocopherols and UV-visible detector for the other phytochemicals. Comparing the pulp composition it was found that the pulp of blueberry cv. Powderblue showed the highest energetic content, antioxidant capacity and phenolic compounds content. Fruits subjected to lyophilization showed a decline in their antioxidant capacity of approximately 22% in the blackberry pulp and 46% in blueberry, coinciding with the decrease in phenolic compounds content. It was found that there is no uniformity in the degradation of the different tocopherol of blackberry, with  $\alpha$ -tocopherol being the most stable when subjected to lyophilization.

Keywords: berries, antioxidants, chromatography



## 5.0 REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICOS

1. ANTUNES, L.E.C.; DUARTE FILHO, J.; SOUZA, C.M. de. Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. **Pesq. Agropecuária Brasileira**, v.8, n. 3, p.413-419, 2003.
2. ARAÚJO, P.F. **Atividade antioxidante de néctar de amora-preta (*Rubus* spp.) e sua influência sobre os lipídios séricos, glicose sanguínea e peroxidação lipídica em hamsters (*Mesocricetus auratus*) hipercolesterolêmicos.** 2009. 123f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.
3. ARAÚJO, P.F. et. al. Caracterização físico-química do resíduo gerado no processamento de amora-preta. In: 1.Simpósio de segurança alimentar – debatendo qualidade, 1, 2008; Bento Gonçalves, RS; **Anais...**Porto Alegre; SBCTA, 2008.
4. ARAÚJO, P.G.L. et. al. Estabilidade da polpa de frutos de novos clones de aceroleira conservada por congelamento. In: 19. Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos; 19, 2004; Recife; **Anais...** Recife: CBCTA, 2004.
5. ATALA, E. et.al. 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.
6. BARCIA, M.T. et. al. Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE. **Ciênc. Agrárias, Londrina.** v.31, n.2, p. 381-390, 2010.
7. BEHLING, E. B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas Alim. Nutr., Araraquara, v.15, n.3, p. 285-292, 2004
8. BRAND, W.; CUVELIER, M.E.; BERSER, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant. Activity Lebensm.-Wiss. **u.-Technol**, v.28, p.25-30, 1995.
9. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 40, de 21 de março de 2001. Regulamento Técnico para Rotulagem Nutricional Obrigatória de Alimentos e Bebidas Embalados. **Diário Oficial da União**, 22 mar. 2001. Seção I.
10. Brasil. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento Técnico Geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. **Diário Oficial da União**. Instrução Normativa nº 1; 7 de jan. 2000.
11. CHAVES, M.C.V. et. al. Caracterização físico-química do suco da acerola. **Rev. de Biologia e Ciênc. da Terra**, v.4, n.2, p.1-10, 2004.

12. CHIM, J.F. **Caracterização de compostos bioativos em amora-preta (*Rubus* sp.) e sua estabilidade no processo e armazenamento de geléias convencional e light.** 2008. 86f. Tese. (Doutorado) – Programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.
13. CHUN, J. et. al. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. **J. of Food Composit. and Analysis**, v.19, p.196–204, 2006.
14. COSTA, A.T.S. et.al. Efeito do congelamento e do tempo de estocagem da polpa de acerola sobre o teor de carotenóides. **Rev. Bras. de Fruticultura**, v.25, n.1, p. 56-58, 2003.
15. ECK, P. *Blueberry Science*. Rutgers Press, Brunswick, **N.J.** 1988.
16. FERREIRA, D.S. **Compostos bioativos em amora-preta e encapsulação do seu extrato antociânico por gelificação térmica com curdiana.** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2008.
17. GRANADA, G.L.; VENDRUSCOLO, J.L.; TREPTOW, R.O. Caracterização Química e Sensorial de Sucos Clarificados de Amora-Preta (*Rubus spp.*). **Rev. Bras. de Agrociência**, v.7, p.143-147, 2001;
18. IBARZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Operaciones unitárias de laingenieria de alimentos. Lancaster: **Tec. Publishing**, p.822, 1999.
19. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físicoquímicos para análise de alimentos**, v.4, n.15, p.571-591, 2005.
20. JACQUES, A.C. **Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy.** 2009. 49f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.
21. JACQUES, A.C. et. al. Compostos bioativos em pequenas frutas cultivadas na região sul do Estado do Rio Grande do Sul.Braz. **J. Food Technol.**, v.12, n.2, p.123-127, 2009.
22. JACQUES, A.C. et. al. Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy. **Quím. Nova**, v.33, n.8, p.1720-1725, 2010.
23. JAEKEL, L.Z. **Bebida funcional com extratos de soja e de arroz e sua influência no colesterol e glicemia** 2008. 102f. Dissertação (Mestrado) – Programa

de pós-graduação em Ciências e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

24. KALT, W. et. al. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v.47, n.11, p.4638-4644, 1999.

25. KUSKOSKI, E.M. et. al. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciênc. Rural**, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

26. LEES, D.H.; FRANCIS, F.J. Standardization of pigment analysis in **Cran berries. Hortiscience**, v.7, n.1, p.83-84, 1972.

27. LEITÃO, A.M. Estabilidade físico-química, microbiológica e sensorial de néctar de amora-preta (*Rubus* spp.), Cv. Tupy, embalado em polipropileno, no armazenamento. 2007. 64f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

28. LIMA, V.L.G.; MELO, E.A.; LIMA, S. Fenólicos e Carotenoides Totais em Pitanga. **Scientia Agrícola**, v.59, n.3, p.447-450, 2002.

29. MARINOVA, D.; RIBAROVA, F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. **J. of Food Compos. and analysis**. v.20, n.5, p.370-374, 2006.

30. MELO, A.E. et. al. Teor de polifenóis e composição química do mirtilo do grupo Highbush. **Alim. Nutr.**, v.18, n.4, p.365-370, 2007.

31. MENEZES, A.R.V. et. al. Estudo Comparativo do Pó da Acerola Verde (*Malpighia marginata* D.C) Obtido em Estufa por Circulação de Ar e por Liofilização. **Rev Bras. de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n.1, p.1-8, 2009.

32. MORAES, J.O. et. al. Estudo do mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) no processamento de produtos alimentícios. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.27, p.18-22, 2007.

33. MOTA, R.V. Características Químicas e Aceitabilidade de Geléias de Amora-preta de Baixo Teor de Sólidos Solúveis. **Braz. J. Food Technol.**, v.10, n.2, p.116-121, 2007.

34. NACHTIGALL, A.M. et. al. Geléias *light* de amora-preta. **Boletim do CEPPA**, v.22, n.2, p.337-354, 2004.

35. OLIVEIRA, E.N.A. et.al. Obtenção de ubaia desidratada pelo processo de liofilização. **Rev. Brasileira de Tec. Agroind.**, v.4, n.2, p.235-242, 2010.

36. PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.37, n.3, p.64-x, 2003.
37. PERTUZATTI, P.B. Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). 2009. 68f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.
38. RASEIRA, M.C.; ANTUNES, L.E. Aspectos técnicos da cultura da amora-preta. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, 2004. 54p.
39. RODRIGUES-AMAYA, D. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: **ILST Press**, p.64, 2001.
40. RUTZ, J.K. et. al. Compostos antociânicos e fenólicos totais em amora-preta (*Rubus spp.*) cv. tupy em diferentes estádios de maturação.in: **XVII CIC / X ENPOS; 2010; Pelotas, UFPel; 2010**
41. SANTOS, C.A.A.; COELHO, A.F.; CARREIRO, S.C. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. **Ciênc.e Tecn. de Alimentos**, v.28, n.4, p.913-915, 2004.
42. SELLAPPAN, S. et. al. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. **J. Agric. Food Chem**, v.50: p.2432-2438, 2002.
43. SHAHRZAD, S.; BITSCH, I. Determination of some pharmacologically active Phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. **J. of chromatography**, v.741, p.223-231, 1996.
44. SILVEIRA, N.G.A. et. al. Teor de polifenóis e composição química do mirtilo do grupo highbush. **Alim. Nutr.**,v.18, n.4, p.365-370, 2007.
45. SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American J. of Enology and Viticulture, Davis**, v.16, n.3, p.144-158, 1965.
46. SKREDE G, WROLSTEAD RE. Flavonoids from berries and grapes. In: **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. v.2, p.71-133, 2002.
47. STATISTICA–STATSOFT, Inc. STATISTICA (software de análise de dados do sistema), versão 7. www.statsoft.com. 2004.
48. STINTZING, F.C. et. Al. A novel zwitterionic anthocyanin from Evergreen blackberry (*Rubus laciniatus* Willd.). **J Agric Food Chem**, v. 50, p. 396–399, 2002.

49. SUN, J. et. al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **J Agric Food Chem**, v.50, p.7449–7454, 2002.
50. VINCI, G. et. al. Ascorbic acid in fruits: **a liquid chromatographic investigation. Food Chem.**, v.53, p.211-214, 1995.
51. VIZZOTTO, M. et al. Large variation found in the phytochemical and antioxidant activity of peach and plum germplasm. **J. of American Society for the Horticultural Science**, Stanford, v.132, n.3, p.334-340, 2007.
52. WANG, S.Y.; ZHENG, W. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, n.2, p.873-878, 2003.
53. ZAMBIAZI, R.C. The role of endogenous lipid components on vegetable oil stability. Manitoba, Canadá. 1997. 304p. Tese. Foods and Nutritional Sciences Interdepartamental Program. University of Manitoba Winnipeg, 1997.
54. ZHANG, Z.; et. al. 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.

## TABELAS

**Tabela 2. 1** – Determinações físico químicas de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue

| Determinações                             | Valores médios (base úmida)* |                           |
|-------------------------------------------|------------------------------|---------------------------|
|                                           | Amora “in natura”            | Mirtilo “in natura”       |
| pH                                        | 3,04± 0,01 <sup>b</sup>      | 3,24± 0,01 <sup>a</sup>   |
| Acidez (% ácido cítrico)                  | 1,15± 0,02 <sup>a</sup>      | 0,97± 0,05 <sup>b</sup>   |
| Sólidos Totais (°Brix)                    | 8,00 ± 0,06 <sup>b</sup>     | 12,00 ± 0,06 <sup>a</sup> |
| Umidade (%)                               | 92,43± 0,70 <sup>a</sup>     | 86,72± 0,70 <sup>b</sup>  |
| Proteínas (%)                             | 0,95± 0,15 <sup>a</sup>      | 0,69 ± 0,05 <sup>a</sup>  |
| Cinzas (%)                                | 1,66 ± 0,03 <sup>a</sup>     | 0,15 ± 0,03 <sup>b</sup>  |
| Fibra bruta (%)                           | 0,28 ± 0,07 <sup>b</sup>     | 1,08 ± 0,07 <sup>a</sup>  |
| Extrato etéreo (%)                        | 0,53 ± 0,03 <sup>a</sup>     | 0,58 ± 0,03 <sup>a</sup>  |
| Carboidratos (%)                          | 4,30 ± 0,19 <sup>b</sup>     | 10,27 ± 0,19 <sup>a</sup> |
| Açúcares redutores (%)**                  | 14,78 ± 0,73 <sup>b</sup>    | 16,63 ± 0,58 <sup>a</sup> |
| Açúcares não-redutores (%)***             | 9,87 ± 1,13 <sup>b</sup>     | 14,88 ± 1,63 <sup>a</sup> |
| Açúcares totais (%)**                     | 25,17 ± 0,46 <sup>b</sup>    | 32,30 ± 2,30 <sup>a</sup> |
| Valor calórico (Kcal.100g <sup>-1</sup> ) | 26,49 ± 0,01 <sup>b</sup>    | 50,67 ± 0,02 <sup>a</sup> |

\* Os valores representam as médias de 3 repetições ± desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. \*\* % glicose, \* % sacarose

**Tabela 2.2** - Características físico-químicas das polpas, polpas diluídas e produtos liofilizados de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue

| Polpa                      | Acidez<br>(% em ácido<br>cítrico) | pH                       | Compostos<br>fenólicos<br>(mg de ác. Gálico<br>100g <sup>-1</sup><br>de fruju/ta) | Antocianinas<br>(mg cianidina3-<br>glicosídeos100g <sup>-1</sup> de fruta) |
|----------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>Amora “in natura”</b>   | 1,15± 0,002 <sup>b</sup>          | 3,04± 0,01 <sup>e</sup>  | 220,54± 1,63 <sup>b</sup>                                                         | 141,02 ± 1,30 <sup>b</sup>                                                 |
| <b>Amora75%</b>            | 0,83 ± 0,003 <sup>bcd</sup>       | 3,33 ± 0,01 <sup>b</sup> | 188,31 ± 0,79 <sup>c</sup>                                                        | 109,30 ± 0,30 <sup>d</sup>                                                 |
| <b>Amora50%</b>            | 0,71 ± 0,04 <sup>de</sup>         | 3,47 ± 0,01 <sup>a</sup> | 147,30 ± 1,04 <sup>e</sup>                                                        | 80,98 ± 0,90 <sup>f</sup>                                                  |
| <b>Amora Liofilizada</b>   | 1,52± 0,12 <sup>a</sup>           | 3,02± 0,01 <sup>e</sup>  | 187,64 ± 1,64 <sup>c</sup>                                                        | 122,98 ± 2,68 <sup>c</sup>                                                 |
| <b>Mirtilo “in natura”</b> | 0,97± 0,05 <sup>bc</sup>          | 3,24± 0,01 <sup>c</sup>  | 243,76± 1,71 <sup>a</sup>                                                         | 156,03 ± 0,60 <sup>a</sup>                                                 |
| <b>Mirtilo75%</b>          | 0,73 ± 0,02 <sup>cde</sup>        | 3,26 ± 0,01 <sup>c</sup> | 214,21 ± 1,57 <sup>b</sup>                                                        | 127,39 ± 2,30 <sup>c</sup>                                                 |
| <b>Mirtilo50%</b>          | 0,39 ± 0,05 <sup>e</sup>          | 3,34 ± 0,01 <sup>b</sup> | 168,54 ± 1,10 <sup>d</sup>                                                        | 98,48 ± 0,50 <sup>e</sup>                                                  |
| <b>Mirtilo Liofilizado</b> | 0,99 ± 0,03 <sup>bc</sup>         | 3,12 ± 0,01 <sup>d</sup> | 168,33 ± 2,45 <sup>d</sup>                                                        | 138,85 ± 2,52 <sup>b</sup>                                                 |

\* Os valores representam as médias de 3 repetições ± desvio padrão;\*\* Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 2.3** - Compostos fenólicos individuais presentes na polpa e na polpa diluída de amora-preta cv. Tupy e mirtilo cv. Powderblue

| Compostos fenólicos<br>(mg. 100g <sup>-1</sup> ) | Polpas in natura e diluídas |                     |                     |                               |                       |                       |
|--------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                                  | <i>Amora</i><br>"in natura" | <i>Amora</i><br>75% | <i>Amora</i><br>50% | <i>Mirtilo</i><br>"in natura" | <i>Mirtilo</i><br>75% | <i>Mirtilo</i><br>50% |
| Ácido gálico                                     | 90,17 <sup>b</sup>          | 53,83 <sup>d</sup>  | 32,19 <sup>f</sup>  | 119,16 <sup>a</sup>           | 58,56 <sup>c</sup>    | 36,86 <sup>e</sup>    |
| Hidroxibenzóico                                  | 101,47 <sup>a</sup>         | 61,78 <sup>c</sup>  | 48,34 <sup>e</sup>  | 75,10 <sup>b</sup>            | 56,10 <sup>d</sup>    | 42,94 <sup>f</sup>    |
| Catequina                                        | 31,05 <sup>a</sup>          | 17,73 <sup>b</sup>  | 12,44 <sup>c</sup>  | -                             | -                     | -                     |
| Kaempferol                                       | 9,08 <sup>b</sup>           | 5,98 <sup>d</sup>   | 2,58 <sup>f</sup>   | 25,13 <sup>a</sup>            | 12,01 <sup>c</sup>    | 5,66 <sup>e</sup>     |
| Caféico                                          | 22,02 <sup>a</sup>          | 17,76 <sup>b</sup>  | 13,21 <sup>c</sup>  | -                             | -                     | -                     |
| ferúlico                                         | 11,14 <sup>a</sup>          | 7,09 <sup>c</sup>   | 1,48 <sup>f</sup>   | 8,14 <sup>b</sup>             | 3,59 <sup>d</sup>     | 2,68 <sup>e</sup>     |
| Quercitina                                       | -                           | -                   | -                   | 5,03 <sup>a</sup>             | 0,59 <sup>b</sup>     | 0,14 <sup>c</sup>     |
| Total                                            | 264,93 <sup>a</sup>         | 164,17 <sup>c</sup> | 110,24 <sup>e</sup> | 232,56 <sup>b</sup>           | 130,85 <sup>d</sup>   | 88,28 <sup>f</sup>    |

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 2.4** - Compostos antociânicos presentes em polpa in natura e nas polpas diluídas em amora-preta cv. Tupy e mirtilo cv. Podewblue

| Compostos antociânicos<br>(mg. 100g <sup>-1</sup> ) | Polpa e polpas diluídas    |                     |                     |                               |                       |                       |
|-----------------------------------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                                     | <i>Amora</i><br>in natura" | <i>Amora</i><br>75% | <i>Amora</i><br>50% | <i>Mirtilo</i><br>"in natura" | <i>Mirtilo</i><br>75% | <i>Mirtilo</i><br>50% |
| Malvidina                                           | -                          | -                   | -                   | 21,44 <sup>d</sup>            | 13,72 <sup>e</sup>    | 8,06 <sup>f</sup>     |
| Kuromanina                                          | -                          | -                   | -                   | 19,14 <sup>a</sup>            | 15,41 <sup>b</sup>    | 6,43 <sup>c</sup>     |
| Keracina                                            | -                          | -                   | -                   | 27,39 <sup>a</sup>            | 7,35 <sup>b</sup>     | 6,63 <sup>c</sup>     |
| Perlagonidina                                       | -                          | -                   | -                   | 2,77 <sup>a</sup>             | 2,21 <sup>b</sup>     | 1,55 <sup>c</sup>     |
| Cianidina                                           | 139,96 <sup>a</sup>        | 92,64 <sup>b</sup>  | 41,44 <sup>c</sup>  | -                             | -                     | -                     |
| Total                                               | 139,96 <sup>a</sup>        | 92,64 <sup>c</sup>  | 41,44 <sup>c</sup>  | 70,74 <sup>c</sup>            | 38,68 <sup>e</sup>    | 22,67 <sup>f</sup>    |

\* Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 2.5 – Conteúdo total de carotenóides em polpa in natura, liofilizada e diluída de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue**

| Polpa               | Carotenóides<br>(mg de $\beta$ -caroteno.100g <sup>-1</sup> de fruta) |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Amora“in natura”    | 1,55 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>                                          |
| Amora75%            | 1,51 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>                                         |
| Amora50%            | 1,46 $\pm$ 0,01 <sup>bc</sup>                                         |
| Amora Liofilizada   | 0,53 $\pm$ 0,03 <sup>g</sup>                                          |
| Mirtilo“in natura”  | 1,40 $\pm$ 0,01 <sup>cd</sup>                                         |
| Mirtilo75%          | 1,36 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>                                          |
| Mirtilo50%          | 1,25 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>                                          |
| Mirtilo Liofilizado | 0,61 $\pm$ 0,02 <sup>f</sup>                                          |

\* Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 2.6 – Conteúdo de carotenóides em polpa liofilizada, polpa in natura e polpa diluída de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue**

| Polpa               | Carotenóides ( $\mu$ g. 100g <sup>-1</sup> ) |                   |                        |                    |
|---------------------|----------------------------------------------|-------------------|------------------------|--------------------|
|                     | $\beta$ - caroteno                           | Licopeno          | $\beta$ -criptoxantina | Total              |
| Amora“in natura”    | 61,43 <sup>a</sup>                           | 0,02 <sup>a</sup> | 0,24 <sup>a</sup>      | 61,69 <sup>a</sup> |
| Amora 75%           | 31,21 <sup>c</sup>                           | -                 | 0,18 <sup>a</sup>      | 33,39 <sup>c</sup> |
| Amora 50%           | 19,55 <sup>d</sup>                           | -                 | 0,16 <sup>b</sup>      | 19,71 <sup>d</sup> |
| Amora Liofilizada   | 53,36 <sup>b</sup>                           | -                 | 0,22 <sup>a</sup>      | 53,36 <sup>b</sup> |
| Mirtilo“in natura”  | 8,09 <sup>e</sup>                            | 0,02 <sup>a</sup> | 0,08 <sup>c</sup>      | 8,09 <sup>e</sup>  |
| Mirtilo 75%         | 3,95 <sup>f</sup>                            | -                 | 0,06 <sup>c</sup>      | 4,01 <sup>f</sup>  |
| Mirtilo 50%         | 1,34 <sup>g</sup>                            | -                 | 0,02 <sup>d</sup>      | 1,35 <sup>g</sup>  |
| Mirtilo Liofilizado | 0,86 <sup>g</sup>                            | -                 | -                      | 0,86 <sup>g</sup>  |

\* Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



**Tabela 2.7 – Conteúdo de tocoferóis da polpa liofilizada, da polpa e polpa diluída de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue**

| Polpa               | Tocoferóis ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ ) |                                  |                     | Total             |
|---------------------|--------------------------------------|----------------------------------|---------------------|-------------------|
|                     | $\delta$ -tocoferol                  | ( $\gamma$ + $\beta$ )-tocoferol | $\alpha$ -tocoferol |                   |
| Amora               | 0,50 <sup>a</sup>                    | 5,74 <sup>a</sup>                | 3,50 <sup>a</sup>   | 9,74 <sup>a</sup> |
| Amora 75%           | 0,25 <sup>c</sup>                    | 0,25 <sup>c</sup>                | 2,25 <sup>c</sup>   | 2,75 <sup>c</sup> |
| Amora 50%           | 0,25 <sup>c</sup>                    | 0,25 <sup>c</sup>                | 2,24 <sup>c</sup>   | 2,74 <sup>c</sup> |
| Amora Liofilizada   | 0,42 <sup>b</sup>                    | 0,49 <sup>b</sup>                | 2,98 <sup>b</sup>   | 3,90 <sup>b</sup> |
| Mirtilo             | -                                    | 0,49 <sup>b</sup>                | 0,25 <sup>d</sup>   | 0,75 <sup>d</sup> |
| Mirtilo 75%         | -                                    | -                                | 0,25 <sup>d</sup>   | 0,25 <sup>e</sup> |
| Mirtilo 50%         | -                                    | -                                | 0,24 <sup>d</sup>   | 0,25 <sup>e</sup> |
| Mirtilo Liofilizado | -                                    | 0,25 <sup>c</sup>                | -                   | 0,25 <sup>e</sup> |

\* Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 2.8 Conteúdo de ácido L-ascórbico na polpa liofilizada, da polpa e polpa diluída e de amora-preta cv. Tupy e mirtilo cv. Powderblue.**

| Polpa               | Ácido L-ascórbico<br>( $\text{mg.100g}^{-1}$ ) |
|---------------------|------------------------------------------------|
| Amora               | 0,50 <sup>e</sup>                              |
| Amora 75%           | 0,29 <sup>g</sup>                              |
| Amora 50%           | -                                              |
| Amora Liofilizada   | 0,43 <sup>f</sup>                              |
| Mirtilo             | 4,46 <sup>a</sup>                              |
| Mirtilo 75%         | 2,50 <sup>d</sup>                              |
| Mirtilo 50%         | 3,49 <sup>c</sup>                              |
| Mirtilo Liofilizado | 3,63 <sup>b</sup>                              |

\* Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 2.9** Atividade antioxidante da polpa in natura, da polpa diluída e da polpa liofilizada de amora-preta cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue

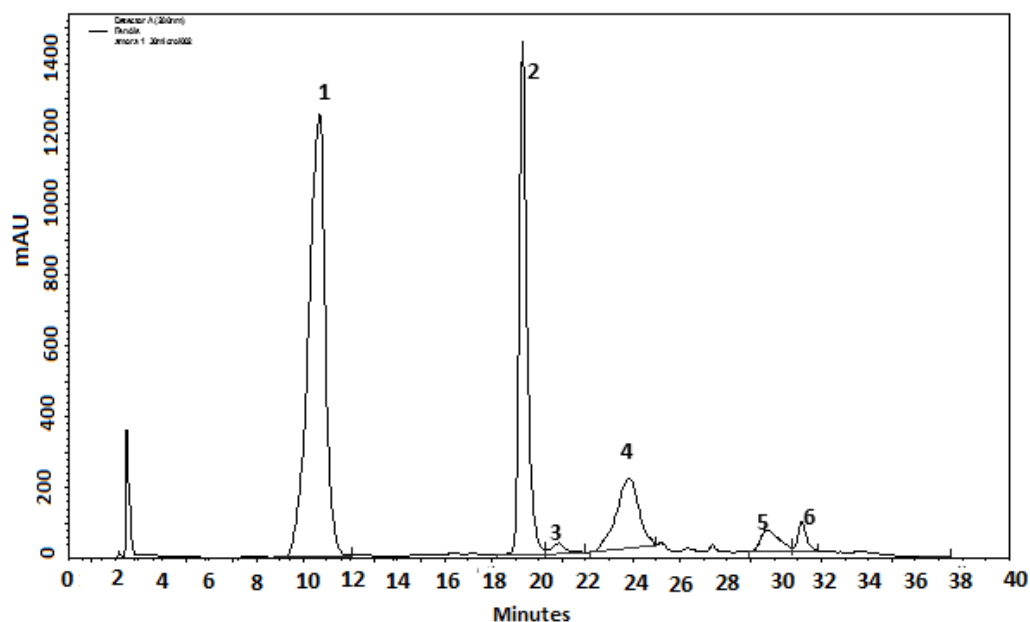
| Polpa               | Atividade antioxidante<br>( $\mu\text{mol. EqTrolox}/100\text{g}$ ) |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Amora               | 1270,86 $\pm$ 33,34 <sup>b</sup>                                    |
| Amora 75%           | 1086,51 $\pm$ 16,25 <sup>c</sup>                                    |
| Amora 50%           | 896,07 $\pm$ 22,15 <sup>d</sup>                                     |
| Amora Liofilizada   | 997,04 $\pm$ 33,52 <sup>c,d</sup>                                   |
| Mirtilo             | 1807,98 $\pm$ 29,05 <sup>a</sup>                                    |
| Mirtilo 75%         | 1293,96 $\pm$ 22,42 <sup>b</sup>                                    |
| Mirtilo 50%         | 1056,74 $\pm$ 12,50 <sup>c</sup>                                    |
| Mirtilo Liofilizado | 894,74 $\pm$ 31,46 <sup>d</sup>                                     |

\*Médias de três repetições  $\pm$  estimativa de desvio padrão;

\*\* Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

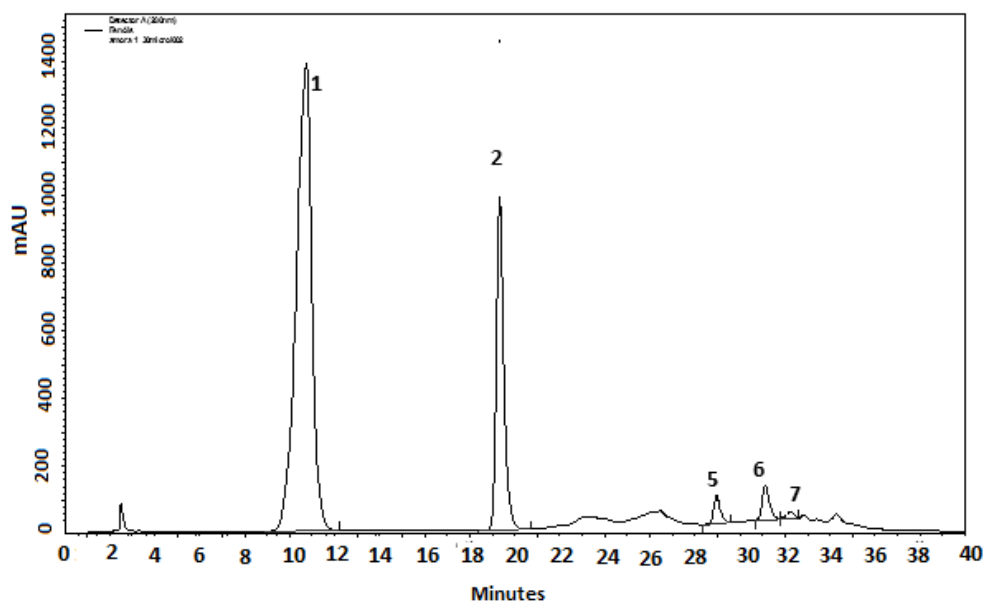
### FIGURAS

#### Fenóis de Amora-preta

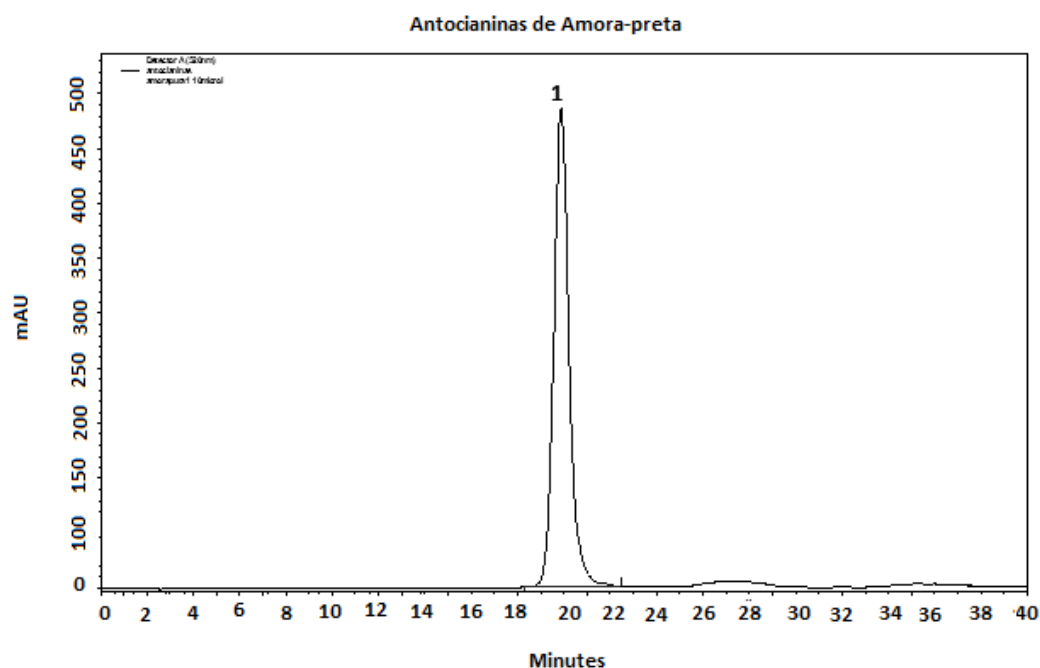


**Figura 2.1** - Cromatograma típico de compostos fenólicos em amora-preta cv. Tupy. CLAE com coluna em fase reversa e detector UV (280 nm). 1: ácido gálico; 2: ácido hidroxibenzoico; 3: catequina; 4: caféico; 5: Kaempferol; 6: ferulico. Fase móvel: gradiente de ácido acético em água (1:99 v/v) e metanol com fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>.

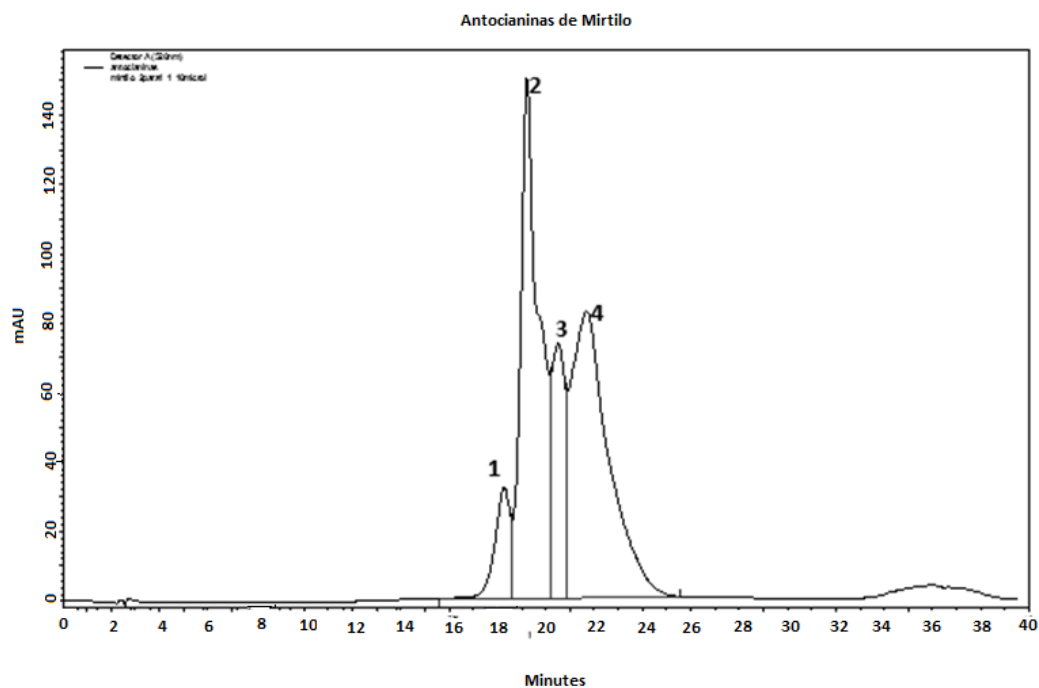
#### Fenóis de Mirtilo



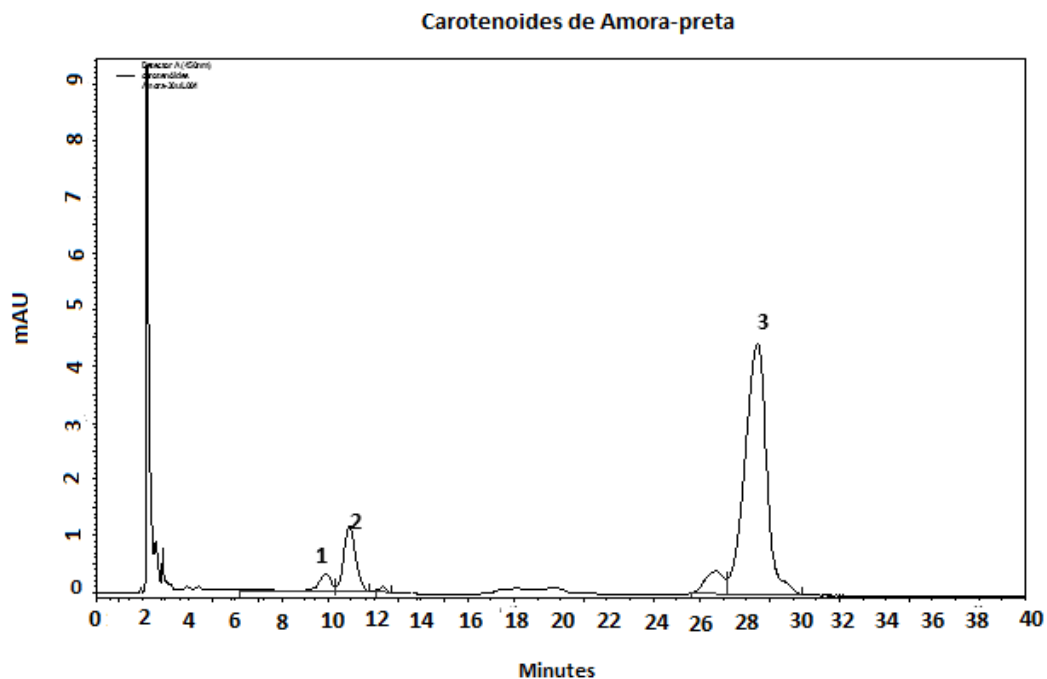
**Figura 2.2** - Cromatograma típico de compostos fenólicos em mirtilo cv. Powderblue, CLAE com coluna em fase reversa e detector UV (280 nm). 1: ácido gálico; 2: ácido hidroxibenzoico; 5: Kaempferol; 6: ferúlico; quercitina. Fase móvel: gradiente de ácido acético em água (1:99 v/v) e metanol com fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>.



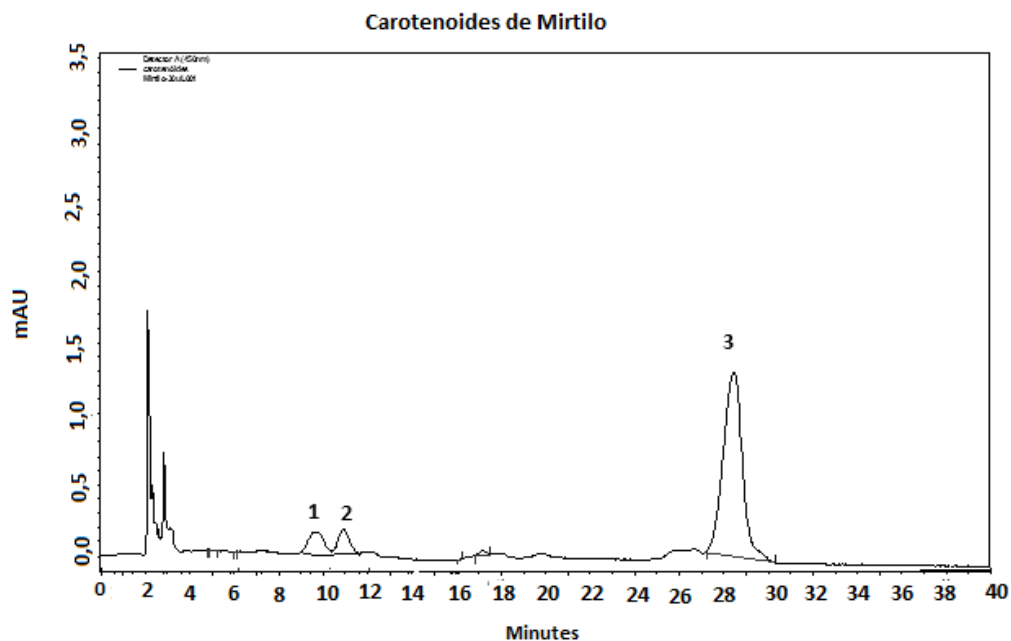
**Figura 2.3** - Cromatograma típico da separação de antocianinas de amora-preta via CLAE, com coluna de fase reversa C18 e detector UV a 520 nm, usando um gradiente com solução aquosa de ácido acético (98:2 v/v), metanol e acetonitrila.



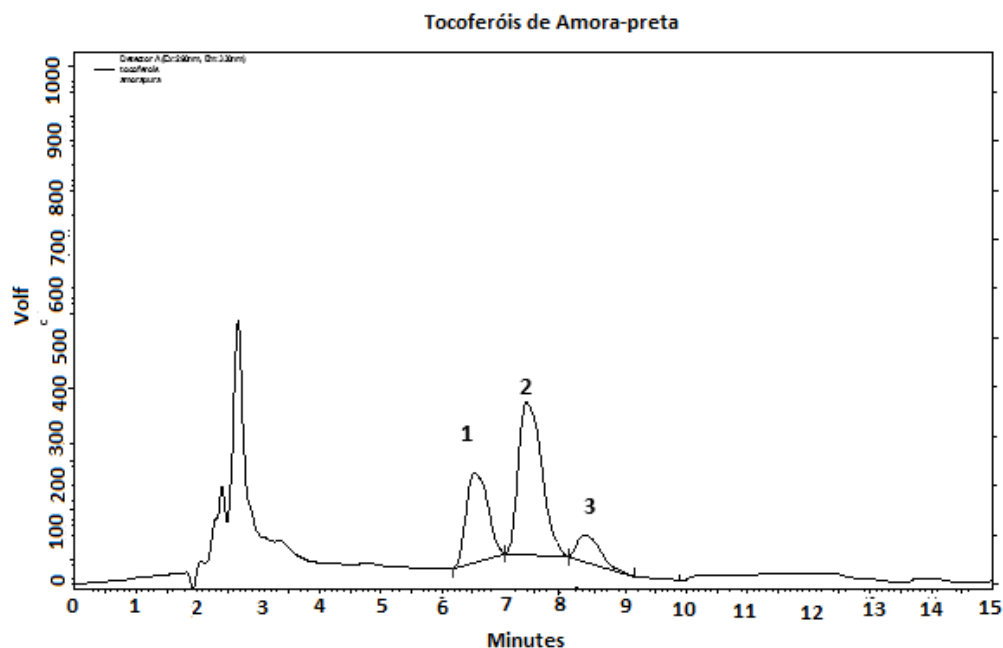
**Figura 2.4** - Cromatograma típico da separação de antocianinas em mirtilo via CLAE, com coluna de fase reversa C18 e detector UV a 520 nm, usando um gradiente de solução aquosa de ácido acético (98:2 v/v), metanol e acetonitrila; 1:Perlagodina; 2:Kuromanina; 3:Keracinina; 4:Malvidina.



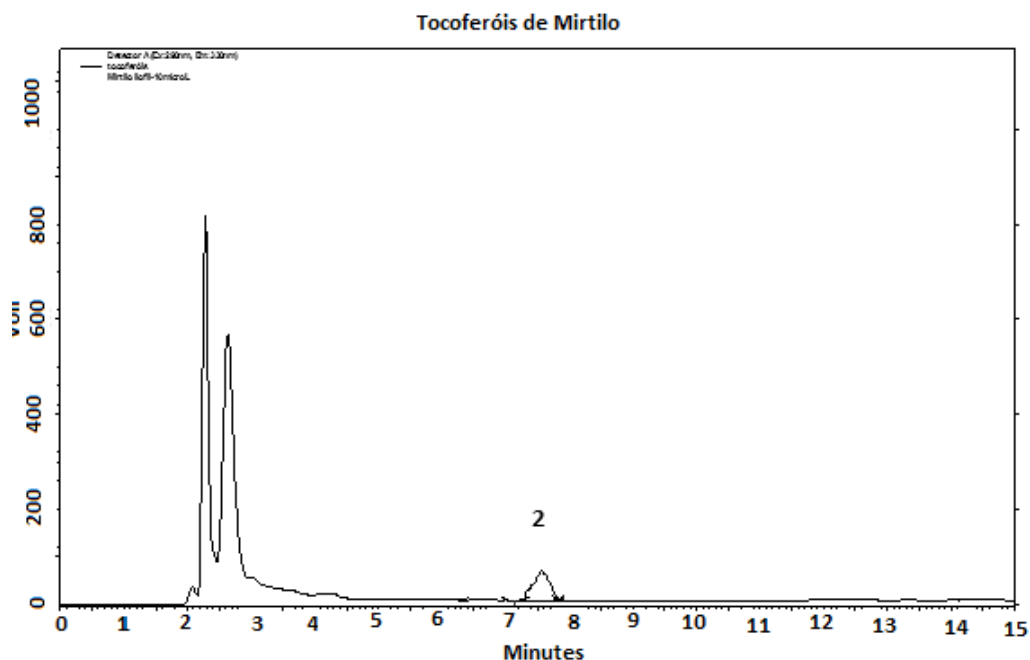
**Figura 2.5** - Cromatogramarelativo a separação de carotenóides em amora-preta cv. Tupy obtido por CLAE, com coluna em fase reversa e detector UV (450 nm). 1: betacriptoxantina; 2: licopeno; 3: beta caroteno. Gradiente de metanol, acetonitrila e acetato de etila, com fluxo de  $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .



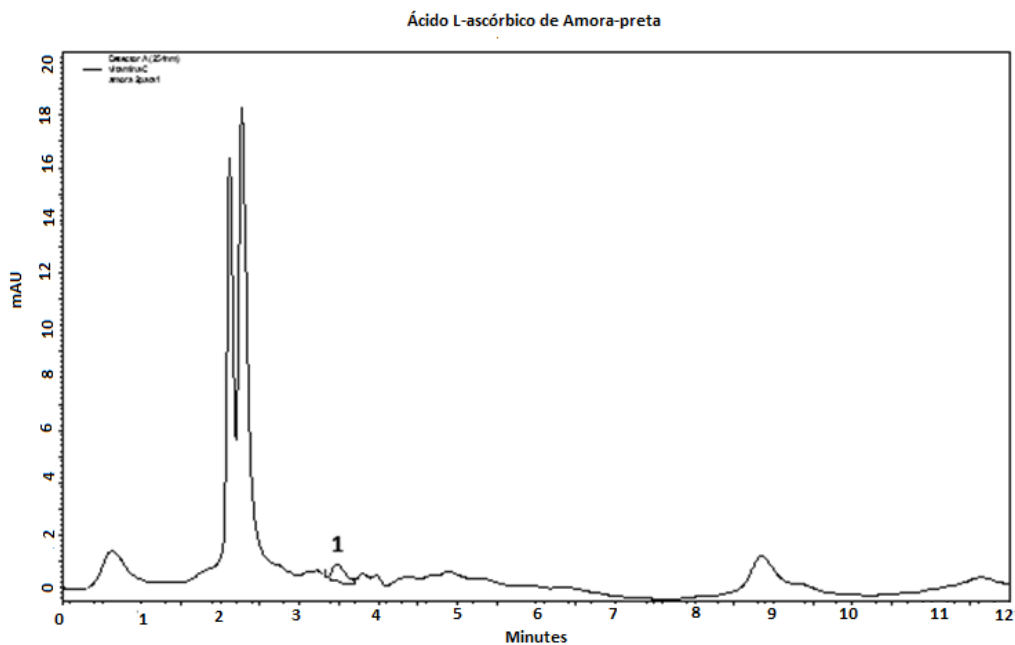
**Figura 2.6** - Cromatograma relativo a separação de carotenóides em mirtilo obtido por CLAE, com coluna em fase reversa e detector UV (450 nm). 1: betacriptoxantina; 2: lipopeno; 3: beta caroteno. Gradiente de metanol, acetonitrila e acetato de etila, com fluxo de  $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .



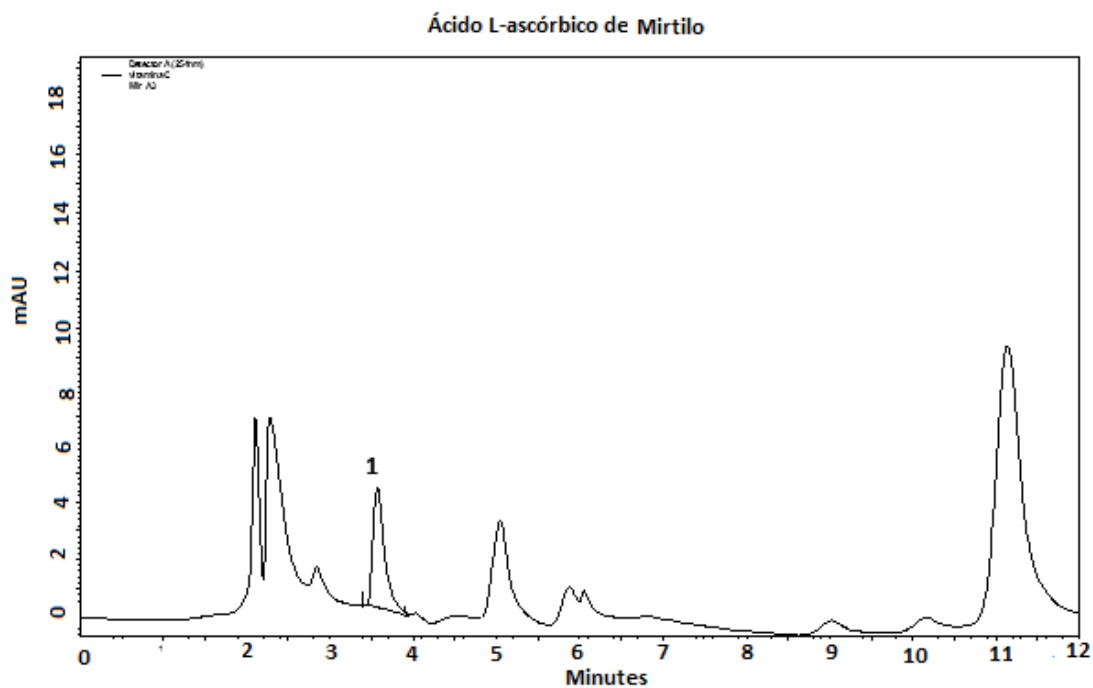
**Figura 2.7** - Cromatograma típico de tocoferóis em amora-preta cv. Tupy por CLAE com coluna em fase reversa e detector de fluorescência, 290 nm de excitação e 330 nm de emissão. 1: deltatocoferol; 2: gama e beta-tocoferol; 3: alfa-tocoferol. Gradiente com acetonitrila: metanol:isopropanol, 50:40:10 v/v/v, com fluxo de  $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .



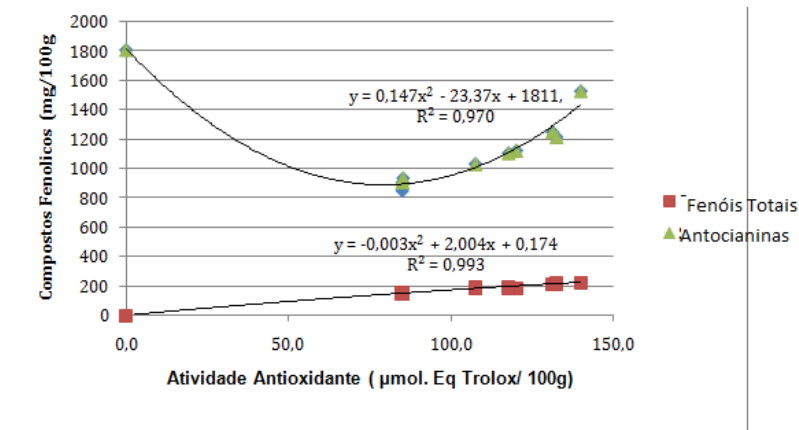
**Figura 2.8** - Cromatograma típico de tocoferóis em mirtilo cv. Powderblue por CLAE com coluna em fase reversa e detector de fluorescência, 290 nm de excitação e 330 nm de emissão. 2: gama e beta-tocoferol; Gradiente com acetonitrila: metanol:isopropanol, 50:40:10 v/v/v, com fluxo de  $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .



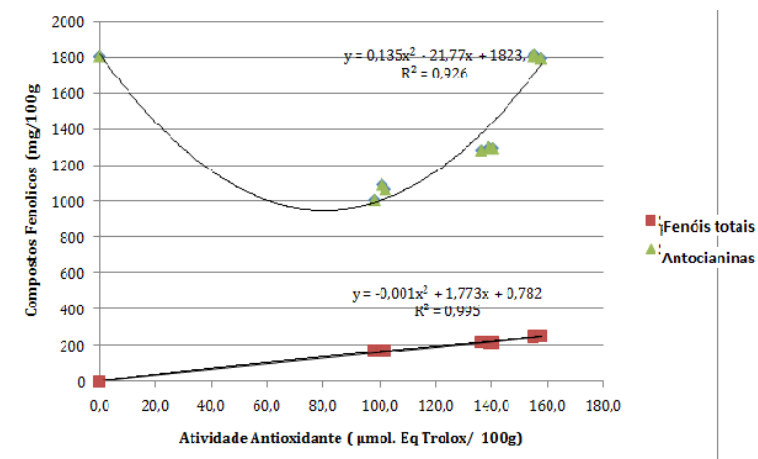
**Figura 2.9** - Cromatograma típico do ácido L-ascórbico em amora-preta cv. Tupy. , por CLAE com coluna em fase reversa e detector UV (254 nm) 1: ácido-L-ascórbico.. Gradiente de solução água ultra pura:ácido acético (99,9:0,1 v/v) e metanol, com fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>.



**Figura 2.10** Cromatograma típico do ácido L-ascórbico em polpa de mirtilo. Cv. Powderblue, por CLAE com coluna em fase reversa e detector UV (254 nm). Fase móvel com solução água ultra pura:ácido acético (99,9:0,1 v/v) e metanol, com fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>.



**Figura 2.11** - Correlação entre o conteúdo total de compostos fenólicos ( $r^2 = 0,98$ ) e de antocianinas totais ( $r^2 = 0,93$ ) como os valores de atividade antioxidante em TEAC ( $\mu\text{molg}^{-1}$ ) de amora-preta.



**Figura 2.12** Correlação entre o conteúdo total de compostos fenólicos ( $r^2 = 0,98$ ) e de antocianinas ( $r^2 = 0,93$ ) como os valores de atividade antioxidante em TEAC ( $\mu\text{molg}^{-1}$ ) de mirtilo.



### **CAPÍTULO III – EFEITO BIOLÓGICO DE EXTRATOS DE AMORA-PRETA (*Rubus sp.*) E DE MIRTILO (*Vaccinium sp.*) EM RATOS WISTAR**

#### **1.0 INTRODUÇÃO**

Dentre os fitoquímicos presentes em frutos, os compostos fenólicos merecem destaque, devido à sua atividade antioxidante. A capacidade de inativação dos radicais livres pelos compostos fenólicos vem sendo atribuída à presença de grupamentos hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) que possuem capacidade de se ligar a radicais livres presentes no organismo, impedindo sua ação, a qual pode causar danos e/ou oxidação de componentes celulares. Dentre os compostos fenólicos presentes em grandes quantidades na amora-preta e no mirtilo, destacam-se as antocianinas, que têm expressiva presença no pericarpo destes frutos (KAISU et al., 2008). Zhang et al. (2005) constataram o efeito inibitório das antocianinas cianidina, delfinidina, pelargonidina, petunidina e malvidina na proliferação de células cancerígenas humanas, originadas em diferentes órgãos: estômago, cólon, mama, pulmão e sistema nervoso central. A ação antioxidante de pequenas frutas vem tendo grande interesse na comunidade científica. Evidencia-se um crescente apelo para inclusão de frutas no hábito alimentar, seja “in natura”, na forma processada ou incorporadas em formulações alimentícias. Os hábitos alimentares têm sido relacionados a fatores determinantes para várias doenças, onde uma alimentação adequada exerce um papel fundamental na prevenção de inúmeras doenças crônicas não transmissíveis (FARIA, et al., 2008).

Tanto o mirtilo quanto a amora-preta apresentam compostos bioativos com a capacidade de atuarem como antioxidantes naturais, que pela ingestão adequada são capazes de minimizar alguns efeitos causados no organismo por espécies reativas de oxigênio, o que pode vir a prevenir a ocorrência de doenças degenerativas (SAKAKIBARA et al., 2003).

Diversos estudos descrevem a relação entre o consumo de antioxidantes naturais com a incidência de doenças. Stoner et al. (2007) encontraram redução na ocorrência de câncer de esôfago e cólon em ratos após a ingestão de um extrato congelado de *berries*. No entanto, são necessários mais estudos sobre a funcionalidade de produtos elaborados com pequenas frutas, buscando verificar o

quão elas são capazes de atuar no organismo e promover efeitos fisiológicos benéficos similares as suas substâncias de origem (ARAÚJO, 2009).

Estudos atuais sugerem que pequenas frutas podem desempenhar um relevante papel em patologias crônicas degenerativas, mas ainda existem lacunas importantes de conhecimento. Embora a compreensão de alguns dos possíveis mecanismos da ação dos fitoquímicos na prevenção de danos oxidativos celulares tenha aumentado na década de 1990, os esforços de investigação continuam centrados na elucidação dos mecanismos de ação a nível celular e molecular.

Frente a estas evidências, a investigação da ação antioxidante das pequenas frutas torna-se relevante, para posterior incentivo à incorporação aos hábitos alimentares saudáveis e assim tornarem-se aliados na prevenção e tratamento de diversas doenças crônicas. Com isto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação antioxidante e hipolipemiante de extratos de amora-preta e de mirtilo no organismo de ratos *wistar*.

## **2.0 MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi desenvolvido nos laboratórios de Frutas e Hortaliças e de Cromatografia de Alimentos – Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), no Laboratório de Ensaios Biológicos da Faculdade de Nutrição da UFPel, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel, Pelotas-RS), e no laboratório do Centro de Estudos em Estresse Oxidativo do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS).

### **2.1 POLPAS DILUIDAS DE AMORA-PRETA E DE MIRTILO**

As polpas diluídas foram formuladas a partir de frutos de amora-preta (*Rubus spp.*) cv. Tupy e de mirtilo cv. Powderblue (*Vaccinium sp.*), ambos da safra 2009/2010. Os frutos foram colhidos manualmente, em seu estágio apropriado de maturação e transportados ao laboratório de cromatografia do DCTA/UFPel, sob refrigeração (0°C) em caixas de isopor, sendo então selecionados de acordo com o seu grau de sanidade e congelados a -18°C. Os frutos previamente congelados (-18°C) foram mantidos à temperatura ambiente até o descongelamento, e em

seguida foram triturados em liquidificador e peneirados para obtenção da polpa. As polpas concentradas foram diluídas com água mineral nas proporções de 50% e 75% p/v (polpa:água), e mantidas congeladas até a sua utilização. Para a administração aos animais, as polpas diluídas foram retiradas do freezer na noite anterior e colocadas em geladeira para ocorrer o descongelamento.

## **2.2 ENSAIO BIOLÓGICO**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ensaaios Biológicos da Faculdade de Nutrição da UFPel, durante o período de fevereiro a março de 2010. O protocolo para a condução do ensaio biológico, número 23110.000491/2009-93 (anexo 1), foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas.

### **2.2.1 ANIMAIS**

Foram utilizados 60 ratos adultos machos (*Rattus Novergicus*) – cepas *Wistar/UFPel*, com peso médio 275 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, com dimensões de 27 cm x 19 cm x 20 cm; produzida em arame de aço Inox Aisi 304 com polimento eletrostático e com pés de 35 cm de altura; comedouro tipo túnel e bebedouro de polipropileno com capacidade para 300 mL; rolha de borracha anti-ácida e bico de aço inoxidável, curvo; com funil para recepção das fezes e becker para coleta de urina (Modelo MA122 - Marca Beiramar). No período do experimento o laboratório permaneceu sob condições de luz e temperatura controladas com fotoperíodo de 12 horas e temperatura e umidade relativa de 22-24°C e 65-75%, respectivamente.

O experimento foi conduzido num total em 35 dias, dos quais os primeiros 5 dias foram destinados à adaptação dos animais às condições do ambiente e à dieta padrão para roedores (AIN-93G) (REEVES et al., 1993), com modificações nas fontes e quantidade de gorduras. Foi oferecido diariamente 5 mL de polpa de fruta diluída, e somente após o consumo total da bebida foi ofertada a dieta e água *ad libitum*.

Ao final do período de adaptação os animais foram pesados e redistribuídos em dez grupos ( $n = 6$ ), mantendo-se o peso médio dos grupos (aproximadamente 312g) de maneira que a diferença entre os mesmos fosse à mínima possível.

### 2.2.2 DIETAS

As dietas experimentais foram preparadas de acordo com dieta padrão para roedores AIN-93M, segundo Reeves *et. al.* (1993). Modificada pela adição de colesterol cristalino ( $1\text{g}.100\text{g}^{-1}$  de dieta) e ácido cólico ( $0,1\text{g}.100\text{g}^{-1}$  de dieta), para a produção de hipercolesterolemia nos animais (Machado *et. al.* 2003). A composição das dietas experimentais (Padrão e Colesterol) está indicada na tabela 3.1.

O experimento foi conduzido com 10 grupos experimentais, sendo 6 animais em cada grupo, conforme descrição abaixo:

- Padrão (P): animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M)
- Polpa diluída ( $\text{PB}^{\text{A-1}}$ ): animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M) + 5mL de polpa diluída de amora-preta na proporção de 50% p/v (polpa:água);
- Polpa diluída ( $\text{PB}^{\text{A-2}}$ ): animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M) + 5mL de polpa diluída de amora-preta na proporção de 75% p/v (polpa:água);
- Polpa diluída ( $\text{PB}^{\text{M-1}}$ ): animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M) + 5mL de polpa diluída de mirtilo na proporção de 50% p/v (polpa:água);
- Polpa diluída ( $\text{PB}^{\text{M-2}}$ ): animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M) + 5mL de polpa diluídas de mirtilo na proporção de 75% p/v (polpa:água);
- Colesterol (C): animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M) acrescida de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol cristalino (p/p);
- Colesterol + Polpa diluída ( $\text{CB}^{\text{A-1}}$ ): animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M) acrescida de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol cristalino (p/p) + 5mL de polpa diluída de amora-preta na proporção de 50% p/v (polpa:água);
- Colesterol + Polpa diluída ( $\text{CB}^{\text{A-2}}$ ): animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M) acrescida de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol cristalino (m/m) + 5mL de polpa diluída de amora-preta na proporção de 75% p/v (polpa:água);
- Colesterol + Polpa diluída ( $\text{CB}^{\text{M-1}}$ ): animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M) acrescida de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol cristalino (m/m) + 5mL de polpa diluída de mirtilo na proporção de 50% p/v (polpa:água);

- Colesterol + Polpa diluída (CB<sup>M-2</sup>): animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M) acrescida de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol cristalino (m/m) + 5mL de polpa diluída de mirtilo na proporção de 75% p/v (polpa:água);

**Tabela 3.1** – Formulação das dietas AIN-93 (Padrão) e Controle (Colesterol) em g.Kg<sup>-1</sup>

| <b>Ingredientes</b>     | <b>AIN – 93M<br/>1</b> | <b>Controle<br/>2</b> |
|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| Amido de milho          | 465,690                | 454,690               |
| Caseína                 | 153,400                | 153,400               |
| Maltodextrina           | 75,320                 | 75,320                |
| Sacarose                | 100,000                | 100,000               |
| Óleo de soja            | 40,000                 | 40,000                |
| Colesterol cristalino   | ---                    | 10,000                |
| Acido cólico            | ---                    | 1,000                 |
| Fibra                   | 116,280                | 116,280               |
| Mistura mineral         | 35,000                 | 35,000                |
| Mistura vitamínico      | 10,000                 | 10,000                |
| L-cistina               | 1,800                  | 1,800                 |
| Bitartarato de colina   | 2,500                  | 2,500                 |
| Tetra-butilhidroquinona | 0,008                  | 0,008                 |

**\*Dietas: 1 – dieta padrão    2 – dieta colesterol**

A polpa diluída foi administrada diariamente no período da manhã, em bebedouros plásticos, imediatamente após a retirada da água e da dieta remanescente, a qual foi pesada para controle de ingestão. O procedimento de retirada da água e da dieta também foi realizado com os grupos que não recebiam a polpa diluída (Padrão e Colesterol), para que estes animais sofressem o mesmo grau de estresse dos demais (PB e CB). Após a ingestão da polpa diluída todos os animais receberam dieta e água *ad libitum*. A quantidade de polpa diluída administrada aos animais foi estabelecida com base no peso médio dos mesmos, tendo como parâmetros os observados para humanos, onde, considerando peso corpóreo médio de 60 kg, o consumo de 200 mL de polpa diluída diários seriam suficientes para que se obtivesse o efeito desejado (RODRIGUES, 2003).

No decorrer do experimento foi realizado, diariamente, pesagem da dieta remanescente com o objetivo de monitorar a quantidade diária de ingestão por animal. O peso corporal dos animais foi registrado no início e ao término do

experimento para avaliação do ganho de peso. Estes dados, além de expressarem o ganho de peso e a ingestão de dieta por animal, foram utilizados para determinar o coeficiente de eficiência alimentar (CEA), calculado pela razão entre o ganho de peso e a quantidade total de ração ingerida durante o experimento.

### 2.3 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS HEPÁTICOS E FECAIS

Na determinação de lipídeos totais fecais, as fezes foram maceradas, homogeneizadas e desumidificadas em estufa a 50°C por 4 horas, utilizando-se uma alíquota por grupo. A análise foi realizada seguindo o método de Bligh & Dyer (1959) para extração dos lipídeos totais.

Na determinação dos lipídeos hepáticos totais, 0,5 g das alíquotas ficaram imersas em 5mL de álcool isopropílico, por 48 horas à 4°C. Logo após, foram maceradas seguindo o mesmo protocolo dos lipídeos fecais.

As alíquotas pesadas foram transferidas para tubos de ensaio com capacidade para 70 mL, adicionando-se 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8mL de água destilada. A mistura foi agitada em agitador rotativo (homogeneizador de sangue modelo Phoenix AP 22) por 30 minutos. Após foi adicionado 10mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%, sendo a mistura agitada vigorosamente por 2 minutos. As camadas formadas foram separadas succionando e descartando a camada metanólica superior. Após, a camada inferior foi filtrada em papel filtro quantitativo, transportando-se o filtrado para um tubo de ensaio com capacidade para 30 mL. Os 5 mL do filtrado transferindo foram para um béquer de 50mL previamente tarado. O solvente foi evaporado em estufa a 100°C. Os conteúdos totais de lipídeos presente foram calculados de acordo com a equação 1.

$$\% \text{ lipídeos totais} = \frac{\text{peso dos lipídeos} \times 4 \times 100}{\text{so da amostra (g)}} \text{ (eq.1)}$$

### 2.4 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

Ao final do período do experimento (30 dias), com os animais em jejum de 12-14 horas, coletou-se amostras de sangue por meio de punção da aorta utilizando-se uma seringa heparinizada. O plasma foi separado após centrifugação a 3.000 rpm

por 15 minutos, transferido para tubos de Eppendorfs e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

Após a retirada da amostra de sangue, o cérebro e o fígado foram removidos e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. Ao serem analisados, os fígados dos animais foram lavados com solução salina 0,9%, secos em papel filtro e pesados em balança de precisão, utilizando uma alíquota de 0,5 g para as quantificações.

#### **2.4.1 DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL TOTAL SÉRICO E HEPÁTICO**

O colesterol total sérico ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) e hepático ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) foram determinados segundo o método proposto por Haug & Hostimark (1987), e quantificados por sistema enzimático (colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase DOLES Diagnóstica®).

#### **2.4.2 DETERMINAÇÃO DE TRIACILGLICEROL SÉRICO E HEPÁTICO**

Os triacilgliceróis séricos ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) e hepáticos ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) foram determinados segundo métodos descritos por Haug & Hostimark (1987) e quantificados por sistema enzimático (lípase, glicerolquinase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase DOLES Diagnóstica®).

#### **2.4.3 DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL VLDL SÉRICO**

A concentração de VLDL-c foi calculada pela equação de Friedewald (Eq.2).

$$\text{VLDL} = \text{TG}/5 \text{ (eq.2)}$$

#### **2.4.4 DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL LDL SÉRICO**

O LDL-c foi estimado pela fórmula de Friedewald (Eq.3).

$$\text{LDL} = \text{CT} - \text{HDL} - \text{VLDL} \text{ (eq.3)}$$

## **2.5 ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

A atividade das enzimas antioxidantes foi realizada no fígado e no córtex frontal, sendo a atividade da superóxido dismutase e da catalase padronizadas pela quantidade de proteína total, determinada pelo método Lowry et al. (1951) usando-se albumina de soro bovino como padrão.

### **2.5.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada através do método descrito por KLAMT et al. (2002), quantificada em 60 µg das amostras do cortex frontal e do fígado homogeneizado, as quais foram incubadas em 35 µL de tampão específico (pH=5,5) na presença de adrenalina a 37°C. A absorbância foi monitorada por 60s em 480 nm pela taxa de inibição da reação auto-catalítica adrenocromo, em solução tampão contendo 1 mM de Madrenaline/50 glicina-NaOH (pH=10.2) / 1 mM catalase. O resultado foi expresso em U SOD.mg de proteína<sup>-1</sup> (uma unidade de atividade de superóxido dismutase foi definida como a quantidade necessária para reduzir a velocidade da reação em 50%).

### **2.5.2 CATALASE (CAT)**

A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por AEBI (1984). As amostras do cortex central e do fígado homogeneizado foram incubadas em um tampão específico na presença de peróxido de hidrogênio. Centrifugou-se 300 µL de amostra, acrescentando-se 1 mL de tampão fosfato 14 mM com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40µL) à 100 µL do sobrenadante. Absorbância foi monitorada por 60 segundos em 240 nm. Os resultados foram expressos em unidades de atividade de catalase por mg de proteína (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto por mg de proteína).

## **2.6 CONTEÚDO SULFIDRILA TOTAIS (SH)**

O conteúdo de tiol total (SH) foi determinado de acordo com método descrito por ELLMAN (1959) e WENDEL (1981). Volumes de amostras de 100 µL do cortex



frontal e do fígado homogeneizado foram adicionados a uma cubeta contendo 680mL de PBS (pH=7,4), com branco de 20  $\mu$ L DTNB (2mM), baseado na reação do ácido 5,5'-ditio-bis-2nitrobenzóico (DTNB) com os grupamentos SH total (tiol reduzido) de proteínas e outros compostos tiólicos como GSH. Os grupamentos tióis reduzidos foram marcados com ácido ditionitrobenzóico (DTNB). A marcação foi lida em espectrofotômetro a 412 nm. O conteúdo de grupamentos sulfidril (-SH) não-protéicos foi estimado nas mesmas amostras após a reação da fração sobrenadante com 20% de TCA. Os resultados foram expressos em  $\mu$ mol SH/mg de proteína.

## **2.7 TESTE NÃO-ENZIMÁTICO DE DEFESA ANTIOXIDANTE**

O teste para a determinação da ação antioxidante total radical-trapping (TRAP) foi realizado conforme método descrito por GHISELLI et. al. (2000). Pesou-se 100  $\mu$ g de proteína do cortex e fígado homogeneizado, adicionou-se 4  $\mu$ L de tampão glicina (0,1M, pH=8,6) com 2,2'azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH 10mm) e 10 $\mu$ L 5-amino-2,3-dihidro-1,4-phthalazinedione (luminol, 4 mM). A quimioluminescência foi produzida pela reação entre os radicais peroxil formados pela decomposição térmica do AAPH e o luminol, sendo diretamente proporcional aos radicais gerados. Os resultados foram expressos em % de produção do radical em relação ao sistema.

## **2.8 DANO OXIDATIVO DE LIPÍDEOS**

A formação de malonaldeído (MDA), um índice de peroxidação lipídica, foi avaliada pela quantificação com o ácido tiobarbitúrico com espécies reativas (TBARS), como descrito por Esterbauer & Cheeseman (1990). A amostra foi incubada com 600  $\mu$ L de TCA 10%, após centrifugado (10.000 $\times$ g; 10 min), onde removeu-se 500  $\mu$ L do sobrenadante que foi misturado com 500  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico 0,67% (TBA). Após, a amostra foi aquecida em banho de água fervente por 15 minutos TBARS foram determinadas por absorvância a 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol TMP.mg<sup>-1</sup> proteína.

## 2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das avaliações foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%, através do programa STATISTICA versão 7.0.

## 3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 INDICATIVOS BIOLÓGICOS DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Nas Tabelas 3.2. e 3.3 estão apresentados os resultados (média  $\pm$  desvio padrão) do peso inicial, peso final, ganho de peso e consumo total de dieta dos ratos machos *Wistar*/UFPel, alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais.

**Tabela 3.2** – Peso corporal inicial e final (g), ganho de peso (g) e consumo diário de dieta de ratos submetidos a diferentes dietas normolipídicas durante 30 dias

| Grupo*                                      | Peso Inicial<br>(g)             | Peso Final<br>(g)               | Ganho de Peso<br>(g)           | Consumo<br>(g/dia)            |
|---------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 1-Padrão (P) <sup>1</sup>                   | 269,30 $\pm$ 24,84 <sup>a</sup> | 360,16 $\pm$ 12,86 <sup>a</sup> | 90,86 $\pm$ 15,85 <sup>a</sup> | 18,97 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup> |
| 2-Bebida (PB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 284,50 $\pm$ 28,50 <sup>a</sup> | 378,68 $\pm$ 30,46 <sup>a</sup> | 94,18 $\pm$ 7,13 <sup>a</sup>  | 20,27 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup> |
| 3 -Bebida (PB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup> | 276,57 $\pm$ 25,84 <sup>a</sup> | 371,97 $\pm$ 33,89 <sup>a</sup> | 95,40 $\pm$ 22,80 <sup>a</sup> | 20,37 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup> |
| 4 -Bebida(PB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup>  | 268,81 $\pm$ 27,97 <sup>a</sup> | 362,86 $\pm$ 26,86 <sup>a</sup> | 94,05 $\pm$ 11,70 <sup>a</sup> | 19,24 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup> |
| 5 -Bebida (PB <sup>M-2</sup> ) <sup>5</sup> | 270,87 $\pm$ 23,82 <sup>a</sup> | 302,23 $\pm$ 27,99 <sup>b</sup> | 31,37 $\pm$ 8,65 <sup>b</sup>  | 15,69 $\pm$ 2,06 <sup>b</sup> |

Os valores representam as médias de 6 repetições  $\pm$  desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade; <sup>1</sup> dieta padrão (AIN-93M); <sup>2</sup>PB<sup>A-1</sup>(AIN-93M + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>3</sup>PB<sup>A-2</sup>(AIN-93M+ 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v); <sup>4</sup>PB<sup>M-1</sup>(AIN-93M+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>5</sup>PB<sup>M-2</sup>(AIN-93M+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

Segundo De Luca et al. (1996) a quantidade média de ração para atender as necessidades nutricionais de ratos situa-se na faixa de 12 a 15 g por dia. Considerando-se os grupos estudados, apenas o grupo PB<sup>M-2</sup> ingeriu a quantidade média recomendada de ração, ou seja, 15,69 g por dia, enquanto que os demais grupos consumiram quantidades superiores, cujo valor médio foi de 19,17 g por dia.

**Tabela 3.3** – Peso corporal inicial e final (g), ganho de peso (g) e consumo diário de ração de ratos submetidos a diferentes dietas hipercolesterolêmicas durante 30 dias

| Grupo*                                       | Peso Inicial (g)            | Peso Final (g)              | Ganho e Peso (g)           | Consumo (g/dia)           |
|----------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 1–Colesterol (C) <sup>1</sup>                | 282,51 ± 26,01 <sup>a</sup> | 374,55 ± 14,42 <sup>a</sup> | 92,04 ± 16,76 <sup>a</sup> | 20,37 ± 1,72 <sup>a</sup> |
| 2 –Bebida (CB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 282,28 ± 19,20 <sup>a</sup> | 380,23 ± 26,21 <sup>a</sup> | 97,95 ± 14,33 <sup>a</sup> | 18,34 ± 3,95 <sup>a</sup> |
| 3 –Bebida (CB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup>  | 271,84 ± 18,80 <sup>a</sup> | 366,53 ± 18,37 <sup>a</sup> | 94,69 ± 25,22 <sup>a</sup> | 18,30 ± 1,69 <sup>a</sup> |
| 4 –Bebida (CB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup>  | 279,61 ± 34,10 <sup>a</sup> | 356,09 ± 48,75 <sup>a</sup> | 76,48 ± 36,16 <sup>a</sup> | 20,55 ± 1,05 <sup>a</sup> |
| 5 –Bebida (CB <sup>Mb-2</sup> ) <sup>5</sup> | 266,64 ± 33,20 <sup>a</sup> | 342,79 ± 30,09 <sup>a</sup> | 76,15 ± 8,69 <sup>a</sup>  | 19,78 ± 1,31 <sup>a</sup> |

Os valores representam as médias de 6 repetições ± desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade; <sup>1</sup>Colesterol(C) (AIN-93M acrescida de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol cristalino (p/p)); <sup>2</sup>CB<sup>A-1</sup>(Colesterol + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% v/v); <sup>3</sup>CB<sup>A-2</sup>(Colesterol+ 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% v/v); <sup>4</sup>CB<sup>M-1</sup>(Colesterol+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% v/v); <sup>5</sup>CB<sup>Mb-2</sup>(Colesterol+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% v/v).

No início do experimento os grupos apresentaram variação de peso muito próxima. Os grupos com dieta sem adição de colesterol e com dieta com adição de 1% colesterol e 0,1% de ácido cólico demonstraram variações de peso similares durante o período experimental, com exceção da dieta com mirtilo a 75% na dieta normolipídica e das dietas com mirtilo a 50% e 75% na dieta hipercolesterolêmicas.

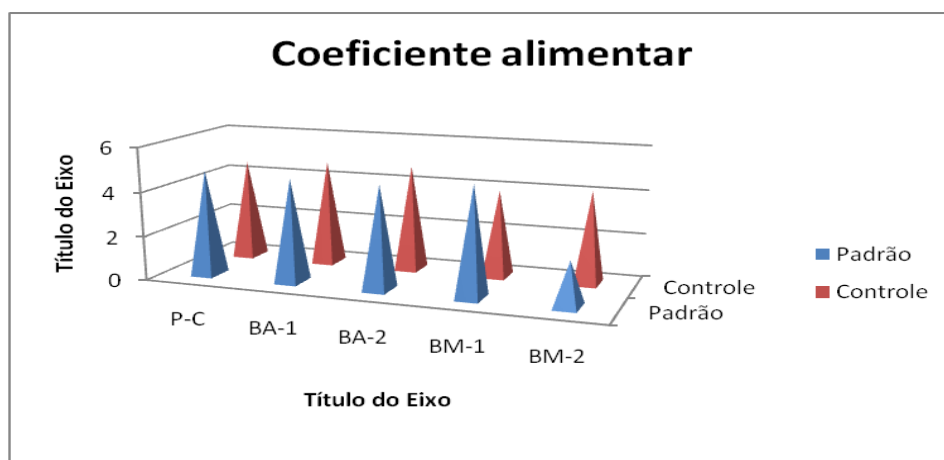
O grupo que consumiu a dieta normolipídica com mirtilo na concentração de 75% (PB<sup>M-2</sup>) demonstrou menor ganho de peso que os demais, coincidindo com o menor consumo/dia. Dentre os demais grupos, observou-se inclusive um aumento no ganho de peso dos ratos que consumiram mirtilo e amora-preta em relação a dieta padrão, mesmo consumido quantidades similares de alimento/dia.

Lamarão & Fialho (2009) sugerem que existe interdependência entre a via de administração do polifenol e a redução na ingestão alimentar. Neste sentido, Molan et al. (2008) ao avaliarem o consumo diário de mirtilo em 30 ratas adultas durante 10 semanas observaram que estes animais reduziram o consumo de dieta entre 6% a 9% ao dia e demonstraram ganho de peso 5% a 10% inferior aos ratos do grupo controle. No presente estudo os ratos em dieta normolipídica, que receberam a maior concentração de polpa de mirtilo diluída (75%), apresentaram redução média de 17% no consumo alimentar, com uma expressiva redução no ganho de peso, comparando-se ao tratamento padrão que recebeu a dieta e água ad libitum.

Na dieta hipercolesterolêmica observou-se um menor ganho de peso dos grupos alimentados tanto com mirtilo a 50% quanto a 75%, mas em ambos os grupos ocorreu o consumo de quantidades similares de dieta/dia. Não se observou mesmo efeito no grupo alimentado com dieta com amora-preta, os quais não diferiram do controle, tanto no ganho de peso quanto no consumo/dia.

St-Onge (2005) relatou que a inclusão de alimentos ou o substituição de alimentos habituais por outros que aumentam o gasto energético (EE) ou melhoram a saciedade pode ser um modo prático para manter um peso corporal estável ou para auxiliar na perda de peso. Embora os mecanismos que fundamentam os efeitos do extrato de mirtilo na saciedade alimentar, ainda não sejam totalmente compreendidos, estudos de Mei (1992) demonstram que o mirtilo pode estimular aminoácidos que atuam como receptores no intestino, estes por sua vez desempenham um papel na indução da saciedade, desencadeando a liberação de hormônios tais como a colecistocinina (CCK) (Mei, 1992).

O coeficiente de eficiência alimentar (CEA), resultado da razão entre o ganho de peso total e o consumo total de dieta durante o experimento (30 dias), foi equivalente para todos os grupos, com exceção do grupo BM-2: Padrão, indicando semelhança entre os mesmos na conversão do alimento ingerido e que provavelmente, o percentual de colesterol adicionado à dieta não promoveu o aumento de peso nos animais, porém a ingestão da polpa de mirtilo, ocasionou uma redução no coeficiente alimentar. A figura 3.1 expressa o coeficiente alimentar após 30 dias de experimento.



**Figura 3.1**– Coeficiente de eficiência alimentar de dietas oferecidas à ratos machos *Wistar/UFPeI* durante 30 dias Série 1 P (AIN-93M) e Série 2 C (AIN-93M -com suplementação de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol). n= 6 ratos/grupo. BA-1(amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v), BA-2 (amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v), BM-1(mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v), BM-2 (mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

### 3.2 LIPÍDEOS TOTAIS: HEPÁTICOS E FECAIS

Nas Tabelas 3.4 e 3.5 estão apresentados os resultados (média  $\pm$  desvio padrão) dos lipídeos hepáticos, fecais (base seca) e peso do fígado dos ratos machos *Wistar/UFPel*, alimentados durante 30 dias, com dietas experimentais normolipídicas e hipercolesterolêmicas.

**Tabela 3.4** – Lipídeos totais hepáticos e fecais, peso do fígado dos ratos machos *Wistar/UFPel* alimentados durante 30 dias com as dietas normolipídicas experimentais

| Grupo*                                      | Fígado<br>(g.100g <sup>-1</sup> ) | Fezes<br>(g.100g <sup>-1</sup> ) | Peso do fígado<br>(g)         |
|---------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 1-Padrão (P) <sup>1</sup>                   | 4,79 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>      | 2,75 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>     | 11,98 $\pm$ 1,50 <sup>a</sup> |
| 2-Bebida (PB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 5,67 $\pm$ 0,85 <sup>a</sup>      | 2,82 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>     | 12,88 $\pm$ 1,59 <sup>a</sup> |
| 3 -Bebida (PB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup> | 5,19 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>      | 3,14 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>     | 12,23 $\pm$ 2,54 <sup>a</sup> |
| 4 -Bebida(PB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup>  | 5,76 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>      | 2,82 $\pm$ 0,39 <sup>b</sup>     | 12,20 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup> |
| 5 -Bebida (PB <sup>M-2</sup> ) <sup>5</sup> | 4,67 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>      | 3,03 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>     | 9,62 $\pm$ 1,83 <sup>b</sup>  |

Os valores representam as médias de 6 repetições  $\pm$  desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade (p<sub>0,05</sub>); <sup>1</sup> dieta padrão (AIN-93M); <sup>2</sup> PB<sup>A-1</sup> (AIN-93M + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>3</sup> PB<sup>A-2</sup> (AIN-93M+ 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v); <sup>4</sup> PB<sup>M-1</sup> (AIN-93M+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>5</sup> PB<sup>M-2</sup> (AIN-93M+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

Pela tabela 3.4 observa-se comportamento semelhante na quantidade de gordura armazenada no fígado para os grupos que receberam dieta normolipídica. Entretanto, os grupos que receberam a bebida contendo polpa de amora-preta a 75% e de mirtilo a 75%, apresentaram diferenças significativas estatísticas (p $\leq$ 0,05) superiores comparando-se o controle aos demais grupos, em relação ao teor de lipídeos excretados nas fezes. Isto pode ter sido ocasionado pela ação que determinados compostos fenólicos exercem sobre o metabolismo lipídico, aumentando a excreção de sais biliares nas fezes (ARAÚJO, 2009). De acordo com Yamamoto et al. (1999) a redução do peso hepático ocasionaria menor deposição de lipídeos no fígado, comportamento observado neste estudo através do grupo de animais que ingeriu ração com polpa de mirtilo 75%, o qual apresentou menor peso hepático.

Os dados da tabela 3.5 demonstram que os grupos que receberam o suco das polpas de frutas com uma dieta hiperlipídica, demonstraram diferença significativa nos teores de lipídeos hepáticos, com exceção do grupo que ingeriu polpa de amora-preta 50%; a diferença significativa foi confirmada para todos os grupos que ingeriram polpa na excreção de lipídeos fecais e no peso do fígado. O grupo de animais que consumiu polpa de mirtilo 75%, apresentou os melhores resultados para os parâmetros analisados.

**Tabela 3.5** – Lipídeos totais hepáticos e fecais, peso do fígado dos ratos machos Wistar/UFPeI alimentados durante 30 dias com as dietas hipercolesterolêmicas experimentais

| Grupo*                                       | Lipídeos-Fígado<br>(g.100g <sup>-1</sup> ) | Lipídeos-Fezes<br>(g.100g <sup>-1</sup> ) | Peso do fígado<br>(g)       |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|
| 1–Colesterol (C) <sup>1</sup>                | 13,21± 1,59 <sup>a</sup>                   | 7,82 ± 0,45 <sup>c</sup>                  | 16,09 ± 0,96 <sup>a</sup>   |
| 2 –Bebida (CB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 12,72± 1,10 <sup>a</sup>                   | 12,31± 0,61 <sup>a,b</sup>                | 14,96± 1,11 <sup>a,b</sup>  |
| 3 –Bebida (CB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup>  | 12,48 ± 1,44 <sup>a</sup>                  | 12,78± 1,59 <sup>a,b</sup>                | 14,66± 1,40 <sup>a,b</sup>  |
| 4 –Bebida (CB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup>  | 11,04±1,31 <sup>b</sup>                    | 11,12± 1,54 <sup>b</sup>                  | 14,40 ± 3,22 <sup>a,b</sup> |
| 5 –Bebida (CB <sup>Mb-2</sup> ) <sup>5</sup> | 8,49± 0,91 <sup>c</sup>                    | 13,67± 1,39 <sup>a</sup>                  | 12,98 ± 0,89 <sup>b</sup>   |

Os valores representam as médias de 6 repetições ± desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade (p≤0,05); <sup>1</sup> Colesterol(C) (AIN-93M acrescida de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol cristalino (p/p)); <sup>2</sup> CB<sup>A-1</sup> (Colesterol + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>3</sup> CB<sup>A-2</sup> (Colesterol + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v); <sup>4</sup> CB<sup>M-1</sup> (Colesterol + 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>5</sup> CB<sup>Mb-2</sup> (Colesterol+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

As dietas ricas em lipídeos podem induzir a superprodução de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria, onde o aumento da oxidação pode causar esteatose hepática. Estudos de PIENIZ et al. (2009) também demonstraram o efeito hepatoprotetor dos polifênóis de frutas e hortaliças em ratos machos adultos *Wistar*, comportamento semelhante ao evidenciado neste estudo (Tabela 3.5).

Neste estudo observa-se também que as dietas ricas em colesterol induziram um aumento importante no valor de lipídeos no fígado, resultado também encontrado no estudo de Yang e Koo (1997). Segundo Reddy & Rao (2006) o acúmulo de lipídeos no fígado promove o chamado "fígado gorduroso" nos animais.

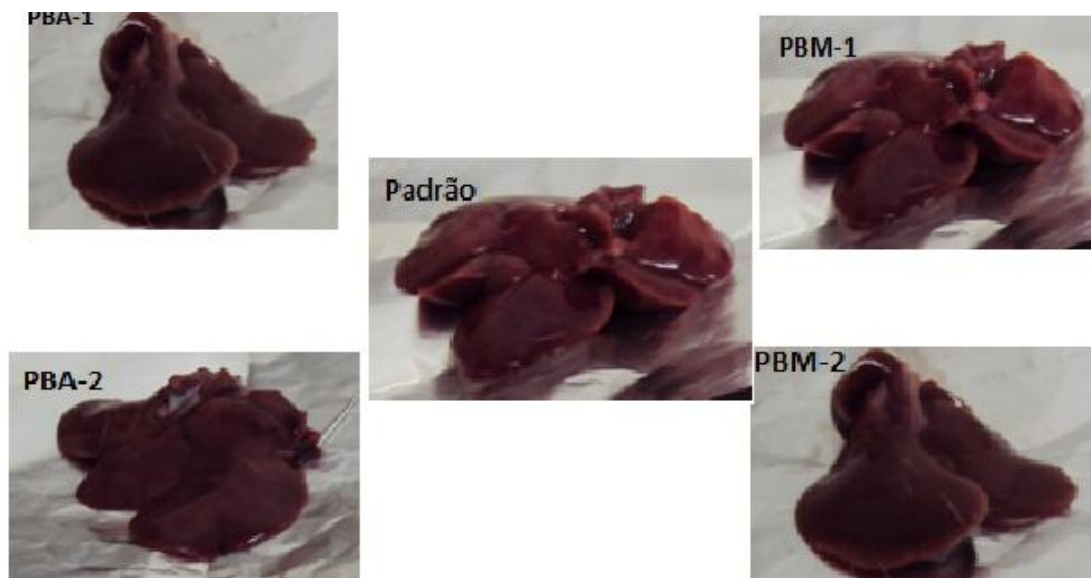
A esteatose hepática tem sido alvo de grande interesse e investigação científica, pois está diretamente relacionada à epidemia de obesidade.

Comparando-se as tabelas 3.4 e 3.5, observa-se que o efeito das polpas de amora-preta e de mirtilo, sobre o percentual de ganho/redução da gordura no fígado, fezes e peso hepático, foi mais expressivo em dietas hiperlipídicas.

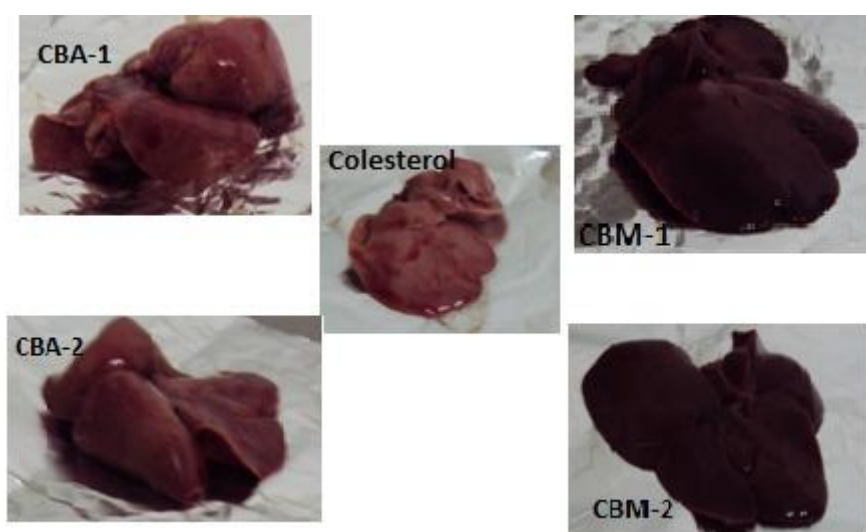
As figuras 3.3 e 3.4 demonstram que o acúmulo de lipídeos pode ser observado pela alteração na coloração do fígado. Os animais dos grupos que consumiram colesterol, apresentaram coloração do fígado vermelho amarelado. Os grupos CB<sup>Mb-1</sup> e CB<sup>Mb-2</sup> diferiram significativamente do grupo C, quanto ao teor de lipídeos totais hepáticos e excretados, apresentando fígados com coloração vermelho intenso, presentes em fígados saldáveis.

De acordo com Raseira & Antunes (2004) os frutos da amoreira-preta, assim como as demais frutas cuja película é consumida conjuntamente, apresentam teores de fibra bruta em torno 2%, o que sugere benefícios relacionados à sua ingestão como uma possível regulação do trato intestinal. Pode-se observar neste estudo que os animais que ingeriram polpa de frutas, provenientes de dietas normolipídicas, obtiveram excreções de lipídeos expressivas somente com polpas de concentrações de 75%. Entretanto, em dietas hipercolesterolêmicas, observou-se diferença significativa para o teor de gordura excretada, entre o grupo colesterol e os grupos que ingeriram polpas das frutas, tanto a 50% quanto a 75%.

Segundo Helbig (2007), a importância da excreção fecal de lipídios e colesterol não está somente na contribuição da regulação dos níveis séricos de colesterol e frações, mas também na prevenção de determinadas patologias. Alguns dos fatores dietéticos mais importantes que parecem predispor a grande incidência de câncer colo-retal são os baixos conteúdos de ingestão fibras alimentares e a ingestão de altos teores de gordura (TSENG et al., 1996; FORMAN et al., 2004).



**Figura 3.2** – Fígados dos ratos machos *Wistar*/UFPeI alimentados durante 30 dias. Dieta Padrão (AIN-93M)  $PB^{A-1}$  (AIN-93M + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% v/v);  $PB^{A-2}$  (AIN-93M+ 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% v/v);  $PB^{M-1}$  (AIN-93M+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% v/v);  $PB^{M-2}$  (AIN-93M+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% v/v).



**Figura 3.3** – Fígados dos ratos machos *Wistar*/UFPeI alimentados durante 30 dias. Dieta Colesterol-C (AIN-93M acrescida de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol cristalino (p/p));  $CB^{A-1}$  (Colesterol + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v);  $CB^{A-2}$  (Colesterol+ 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v);  $CB^{M-1}$  (Colesterol+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% v/v);  $CB^{M-2}$  (Colesterol + 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).



### 3.3 COLESTEROL TOTAL E TRIACILGLICEROL HEPÁTICO

Na tabela 3.6 estão apresentados os dados de colesterol total e triacilgliceróis hepáticos, dos ratos machos *Wistar*, alimentados durante 30 dias com dietas normolipídicas experimentais.

**Tabela 3.6** – Colesterol total e triacilglicerol ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) hepáticos dos ratos machos *Wistar*/UFPel alimentados durante 30 dias com as dietas normolipídicas experimentais

| Grupo                                       | Colesterol total<br>( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) | Triacilglicerol<br>( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1-Padrão (P) <sup>1</sup>                   | 17,46 $\pm$ 1,80 <sup>c</sup>               | 142,56 $\pm$ 2,39 <sup>c</sup>             |
| 2-Bebida (PB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 26,98 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup>               | 162,41 $\pm$ 2,60 <sup>b</sup>             |
| 3 -Bebida (PB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup> | 24,77 $\pm$ 2,41 <sup>a,b</sup>             | 142,38 $\pm$ 2,67 <sup>c</sup>             |
| 4 -Bebida(PB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup>  | 22,96 $\pm$ 0,88 <sup>b</sup>               | 169,87 $\pm$ 2,51 <sup>a</sup>             |
| 5 -Bebida (PB <sup>M-2</sup> ) <sup>5</sup> | 17,34 $\pm$ 1,89 <sup>c</sup>               | 142,20 $\pm$ 2,51 <sup>c</sup>             |

Os valores representam as médias de 6 repetições  $\pm$  desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ); <sup>1</sup> dieta padrão (AIN-93M); <sup>2</sup> PB<sup>A-1</sup> (AIN-93M + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>3</sup> PB<sup>A-2</sup> (AIN-93M + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v); <sup>4</sup> PB<sup>M-1</sup> (AIN-93M + 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>5</sup> PB<sup>M-2</sup> (AIN-93M + 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

Os dados da tabela 3.6 demonstram comportamento estatisticamente semelhante entre o padrão e o grupo que ingeriu a dieta com maior concentração de mirtilo (75%) no teor de colesterol total e de triacilglicerol armazenado no fígado. No entanto, os grupos que ingeriram as demais dietas com extratos de amora-preta e de mirtilo apresentaram teores inclusive superiores de colesterol e de triacilgliceróis.

Alguns compostos fenólicos demonstraram ação hipocolesterolêmica, aumentando a excreção de ácidos biliares e inibindo a ação de enzimas com respostas inflamatórias, reduzindo a absorção e ou deposição do colesterol no intestino, fígado, rins e cérebro (ARAÚJO, 2009; ZIMMERMANN, 2010). No entanto, com dietas normolipídicas não se observaram efeitos de redução do colesterol total e de triacilgliceróis hepáticos em função da ingestão de amora-preta e de mirtilo, nas concentrações utilizadas neste estudo.

Porem observa-se um efeito redutor do colesterol total e do triacilglicerol hepático, em dietas hipercolesterolêmicas, para todas as dietas contendo a amora-

preta e o mirtilo. Observa-se os melhores resultados na redução do colesterol total nos grupos que ingeriram polpa de amora-preta, tanto a 50% quanto a 75%; e na redução do triacilglicerol hepático nos grupos que ingeriram polpa de amora-preta a 75%.

Na tabela 3.7 estão apresentados colesterol total e triacilgliceróis hepáticos, dos ratos machos *Wistar*, alimentados durante 30 dias com dietas hipercolesterolêmicas experimentais.

**Tabela 3.7** – Colesterol total e triacilglicerol ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) hepáticos dos ratos machos *Wistar*/UFPel alimentados durante 30 dias com as dietas hipercolesterolêmicas experimentais

| Grupo                                        | Colesterol total<br>( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) | Triacilglicerol<br>( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1–Colesterol (C) <sup>1</sup>                | 40,46 $\pm$ 1,80 <sup>a</sup>               | 274,22 $\pm$ 2,45 <sup>a</sup>             |
| 2 –Bebida (CB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 30,16 $\pm$ 2,47 <sup>c</sup>               | 196,84 $\pm$ 3,45 <sup>b</sup>             |
| 3 –Bebida (CB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup>  | 24,83 $\pm$ 2,62 <sup>d</sup>               | 160,91 $\pm$ 2,79 <sup>d</sup>             |
| 4 –Bebida (CB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup>  | 36,22 $\pm$ 2,95 <sup>a,b</sup>             | 189,28 $\pm$ 3,80 <sup>c</sup>             |
| 5 –Bebida (CB <sup>Mb-2</sup> ) <sup>5</sup> | 33,33 $\pm$ 2,51 <sup>b,c</sup>             | 163,98 $\pm$ 3,56 <sup>d</sup>             |

Os valores representam as médias de 6 repetições  $\pm$  desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ); <sup>1</sup> Colesterol(C) (AIN-93M acrescida de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol cristalino (p/p)); <sup>2</sup>CB<sup>A-1</sup>(Colesterol + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>3</sup>CB<sup>A-2</sup>(Colesterol+ 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v); <sup>4</sup>CB<sup>M-1</sup>(Colesterol+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>5</sup>CB<sup>Mb-2</sup>(Colesterol+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

Trabalhos de Jennings et al. (1988) e Shinick et al. (1990), demonstraram que componentes como psyllium, gomas e pectinas são ricas em fibras solúveis, e promovem redução significativa nas concentrações do colesterol sangüíneo e do fígado de ratos. Fibras mistas contendo ambas as frações solúveis e insolúveis (como a soja e o farelo de aveia) apresentam efeito intermediário, enquanto as fibras em que predomina a fração insolúvel (como o farelo de milho e o farelo de trigo) possuem um pequeno efeito no nível do colesterol plasmático e do fígado, em dietas hipercolesterolêmicas.

### 3.4 DOSAGENS SOROLÓGICAS DE COLESTEROL E TRIACILGLICERÓIS

Nas Tabelas 3.8 e 3.9 são apresentados as dosagens sorológicas (mg.dL<sup>-1</sup>) de colesterol total, HDL-c, LDL-c, VLDL-c e triacilgliceróis dos ratos machos *Wistar/UFPel*, alimentados durante 30 dias, com as dietas normolipídicas e hipercolesterolêmicas.

**Tabela 3.8** – Dosagem sorológica de colesterol total e frações (mg.dL<sup>-1</sup>) dos ratos machos *Wistar/UFPel*, alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais

| Perfil lipídico (mg.dL <sup>-1</sup> )      | Colesterol (mg.dL <sup>-1</sup> ) | HDL – c (mg.dL <sup>-1</sup> ) | LDL - c (mg.dL <sup>-1</sup> ) | VLDL – c (mg.dL <sup>-1</sup> ) | Triacilglicerol (mg.dL <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|
| 1-Padrão (P) <sup>1</sup>                   | 73,16 ± 1,86 <sup>a,b</sup>       | 31,54 ± 1,56 <sup>b</sup>      | 22,57 ± 3,40 <sup>a</sup>      | 19,06 ± 0,34 <sup>b</sup>       | 95,30 ± 1,69 <sup>b</sup>              |
| 2-Bebida (PB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 76,49 ± 1,09 <sup>a</sup>         | 31,48 ± 2,08 <sup>b</sup>      | 23,33 ± 2,95 <sup>a</sup>      | 21,68 ± 0,22 <sup>a</sup>       | 108,39 ± 1,10 <sup>a</sup>             |
| 3 -Bebida (PB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup> | 73,46 ± 4,68 <sup>a,b</sup>       | 35,78 ± 2,37 <sup>b</sup>      | 16,40 ± 7,52 <sup>a,b</sup>    | 21,27 ± 0,73 <sup>a</sup>       | 106,37 ± 3,65 <sup>a</sup>             |
| 4 -Bebida(PB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup>  | 72,28 ± 1,56 <sup>a,b</sup>       | 37,64 ± 5,76 <sup>a,b</sup>    | 15,49 ± 4,60 <sup>a,b</sup>    | 19,15 ± 0,51 <sup>b</sup>       | 95,74 ± 2,56 <sup>b</sup>              |
| 5 -Bebida (PB <sup>M-2</sup> ) <sup>5</sup> | 69,03 ± 1,72 <sup>b</sup>         | 42,10 ± 2,78 <sup>a</sup>      | 11,13 ± 1,74 <sup>b</sup>      | 15,79 ± 0,47 <sup>c</sup>       | 78,96 ± 2,36 <sup>c</sup>              |

Os valores representam as médias de 6 repetições ± desvio padrão; Letras distintas na mesma indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade (p\_0,05); <sup>1</sup> dieta padrão (AIN-93M); <sup>2</sup> PB<sup>A-1</sup> (AIN-93M + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>3</sup> PB<sup>A-2</sup> (AIN-93M+ 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v); <sup>4</sup> PB<sup>M-1</sup> (AIN-93M+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>5</sup> PB<sup>M-2</sup> (AIN-93M+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

Quanto ao perfil lipídico dos ratos submetidos à dieta normolipídica, os níveis séricos de triacilgliceróis mantiveram-se dentro da faixa apresentada por Harkness& Vagner (82 mg.dL<sup>-1</sup>). Observa-se que o grupo com mirtilo a 75% (PB<sup>M-2</sup>), apresentaram o menor valor de Triacilglicerol, diferindo significativamente do grupo P. Valores maiores foram preconizados pelo Centro de Bioterismo da FMUSP (110mg.dL<sup>-1</sup>). Não foi observada diferença significativa no colesterol total sérico, entre os grupos e o grupo P, dos ratos alimentados com dietas normalipídicas; exceto, novamente para o grupo alimentado com mirtilo a 75% (PB<sup>M-2</sup>), o qual demonstrou a menor média do colesterol total sérico. Comparando-se com os resultados obtidos pelo Centro de Bioterismo da FMUSP (2008) (98,9mg.dL<sup>-1</sup>) e pela Canadian Councilpon Animal Care (1993) (42,8 mg.dL<sup>-1</sup>), ressaltam-se valores discrepantes. O valor do HDL-colesterol do grupo PB<sup>M-2</sup> foi superior aos demais grupos, porém semelhante aos relatados por Dantas et al.(2006) (48 mg.dL<sup>-1</sup>).

Os mecanismos de ação pelos quais os fitoesteróis reduzem a absorção do colesterol ainda não são completamente conhecidos (LOTTENBERG, 2009). Comportamento este evidenciado no presente estudo, através da avaliação sorológica do colesterol total, HDL-c, LDL-c, VLDL-c e triacilglicerol, onde observou-se um aumento significativo no teor o VLDL e triacilglicerol, do grupo que ingeriu polpa de amora-preta 50% e 75%, com dieta normolipídicas; entretanto comportamento oposto foi demonstrado pelo grupo que ingeriu polpa de mirtilo 75%.

Portanto, pelos valores inferiores apresentados nas análises sorológicas do colesterol total, LDL-c, VLDL-c e para o triacilglicerol; e os valores superiores apresentados em relação ao conteúdo de HDL-c, observou-se resultado que a alimentação com mirtilo a 75%, sugere um efeito protetor no organismo de ratos Wistar, induzindo a sua possível proteção contra doenças cardiovasculares em dieta normolipídica.

**Tabela 3.9** – Dosagem sorológica de colesterol total e frações (mg.dL<sup>-1</sup>) dos ratos machos *Wistar*/UFPEl, alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais

| Perfil lipídico (mg.dL <sup>-1</sup> )       | Colesterol (mg.dL <sup>-1</sup> ) | HDL – c (mg.dL <sup>-1</sup> ) | LDL - c (mg.dL <sup>-1</sup> ) | VLDL – c (mg.dL <sup>-1</sup> ) | Triacilglicerol (mg.dL <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|
| 1–Colesterol (C) <sup>1</sup>                | 93,91 ± 2,55 <sup>a</sup>         | 27,89 ± 2,39 <sup>c</sup>      | 46,72 ± 4,04 <sup>a</sup>      | 19,31 ± 0,20 <sup>a</sup>       | 96,53 ± 1,00 <sup>a</sup>              |
| 2 –Bebida (CB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 88,45± 2,92 <sup>b</sup>          | 28,76 ± 2,16 <sup>c</sup>      | 41,54 ± 5,38 <sup>a</sup>      | 18,15 ± 0,72 <sup>b</sup>       | 90,73 ± 3,60 <sup>b</sup>              |
| 3 –Bebida (CB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup>  | 84,68 ± 1,22 <sup>b,c</sup>       | 36,71 ± 1,64 <sup>b</sup>      | 32,16 ± 1,77 <sup>b</sup>      | 15,81± 0,48 <sup>c</sup>        | 79,05 ± 2,42 <sup>c</sup>              |
| 4 –Bebida (CB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup>  | 86,28 ± 0,80 <sup>b,c</sup>       | 39,98 ± 1,89 <sup>b</sup>      | 31,34 ± 2,96 <sup>b</sup>      | 15,28 ± 0,65 <sup>c</sup>       | 76,40 ± 3,23 <sup>c</sup>              |
| 5 –Bebida (CB <sup>Mb-2</sup> ) <sup>5</sup> | 82,98 ± 4,54 <sup>c</sup>         | 46,51 ± 0,84 <sup>a</sup>      | 22,50±4,90 <sup>c</sup>        | 13,97 ± 0,40 <sup>d</sup>       | 69,83 ± 1,99 <sup>d</sup>              |

Os valores representam as médias de 6 repetições ± desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade (p≤0,05); <sup>1</sup> Colesterol(C) (AIN-93M acrescida de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol cristalino (p/p)); <sup>2</sup>CB<sup>A-1</sup>(Colesterol + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>3</sup>CB<sup>A-2</sup>(Colesterol+ 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v); <sup>4</sup>CB<sup>M-1</sup>(Colesterol+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>5</sup>CB<sup>Mb-2</sup>(Colesterol+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

O colesterol total foi avaliado no soro dos ratos que receberam dieta hipercolesterolêmica (tabela 3.9), onde se observou que todos os grupos em que foi adicionado polpa de amora-preta (exceto a dieta com amora-preta a 50%) e de mirtilo, apresentaram uma redução significativa do teor de colesterol total sérico em relação ao grupo controle (C), atingindo reduções de até 11,63%.

Segundo Chanandiri et al. (2005), os antioxidantes naturais, como os polifenóis podem ser usados para correção efetiva de índices elevados de colesterol total e de triacilgliceróis no sangue. Oliveira et al. (2002) estudaram o efeito dos flavonóides quercetina e rutina (na dose de 5mg/dia) sobre os níveis de colesterol total de ratos machos hiperlipidêmicos, e verificaram uma redução de 56,4% nos ratos que ingeriram quercetina e de 55% nos ratos que ingeriram rutina, no teor de colesterol sanguíneo.

O efeito benéfico relacionado a produtos que contem compostos fenólicos também foi relatado por Cherem et al. (2007) em estudo realizado com cobaias submetidas à dieta hiperlipídica, com e sem a adição de casca da berinjela rica em compostos antociânicos. Os autores verificaram redução nos níveis de colesterol total e LDL-c, em torno de 45 e 54%, respectivamente, nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica + casca de berinjela; no entanto, os autores não observaram efeito positivo sobre os níveis de triacilgliceróis.

Ribeiro et al. (2004) avaliaram a capacidade das antocianinas da uva em atuar sobre os constituintes plasmáticos de coelhos saudáveis, e verificaram uma redução de 17,38% nos níveis de colesterol total nos animais tratados com estes compostos.

Estudos realizados com ratos hipercolesterolêmicos tratados com extrato de mirtilo demonstram redução sérica nos níveis de LDL- c na ordem de 46%, e no aumento de HDL- c em cerca de 10% (COFFY, 2008). No presente estudo observou-se uma redução significativa nos teores de LDL-c (exceto na dieta com amora-preta a 50%), VLDL-c e triacilgliceróis; e um aumento significativo no teor de HDL-c, para todas as dietas contendo polpa de amora-preta e de mirtilo. Os maiores efeitos foram observados em ratos que ingeriram dietas contendo polpa de mirtilo a 75%.

A redução sérica nos níveis de LDL- c atingiu até 51,84% em ratos que consumiram a ração com polpa de mirtilo a 75% e de 31,16% para os ratos que consumiram a ração com polpa de amora-preta a 75%. O aumento de HDL- c foi na ordem de 40,03% para o consumo de polpa de mirtilo a 75% e de 24,02% para o consumo de polpa de amora-preta a 75%. O teor de triacilglicerídio nos ratos demonstrou redução de 27,66% (dieta com polpa de mirtilo a 75%) e de 18,11% (ração com polpa de amora-preta a 75%). Estes resultados comprovam a atuação

favorável das polpas de frutas vermelhas no perfil de lipídicos séricos em ratos *Wistar*.

A relação HDL/LDL é comumente calculada para avaliar o risco de doenças coronarianas. De acordo com relatos mencionados por Ho et al. (2003), a elevada concentração de LDL-c evidencia processos aterogênicos, enquanto que alto nível de HDL-c tem efeito cardioprotetor. Neste estudo as relações HDL/LDL foram de 1,42; 1,37; 2,62; 2,68 e de 3,86, para série normolipídica, grupos P, PB<sup>A-1</sup>, PB<sup>A-2</sup>, PB<sup>M-1</sup> e PB<sup>M-2</sup> (tabela 3.9), respectivamente. Para série hiperlipídica, as relações HDL/LDL foram de 0,60; 0,70; 1,15; 1,29 e de 2,14, para os grupos C, CB<sup>A-1</sup>, CB<sup>A-2</sup>, CB<sup>M-1</sup> e CB<sup>M-2</sup> (tabela 8), respectivamente. O aumento da relação HDL/LDL dos grupos P para os grupos C, indicaram influência benéfica das polpas de amora-preta e de mirtilo, tanto em animais normo como em hipercolesterolêmicos, pela redução dos índices de LDL-c em ambos os grupos, observando-se maior efeito nos grupos submetidos a dieta normolipídica.

### **3.5 CONTEÚDO SULFIDRILA TOTAIS (SH) E DANO OXIDATIVO DE LIPÍDEOS (TBARS) NO CORTEX CEREBRAL E NO FÍGADO**

Analisando a tabela 3.10 observa-se que não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), entre o tratamento padrão e os tratamentos que ingeriram extrato de polpa de frutas para as determinações de TBARS e SH total, quando os ratos receberam dietas normolipídicas.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento da produção de substâncias oxidantes e/ou uma redução dos níveis de defesa aos antioxidantes do organismo (LEITÃO, 2012). Este é um processo que vem sendo relacionado à patogênese de algumas condições que afetam não somente o sistema nervoso central (SNC), como também vários órgãos do animal (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Os resultados deste estudo demonstraram que não ocorreu diferença significativa na produção de TBARS e de SH no cortex e fígado dos ratos alimentados com polpa de amora-preta e de mirtilo em relação ao tratamento padrão, em dietas normolipídicas. No entanto, mesmo não ocorrendo diferença significativa, observou-se os menores valores nos órgãos dos ratos alimentados com polpa de mirtilo a 75% (tratamento PB<sup>M-2</sup>).

**Tabela 3.10** – Dano oxidativo em lipídeos (TBARS) e conteúdo Sulfidril Total (SH) dos ratos machos *Wistar/UFPel*, alimentados durante 30 dias com as dietas normolipídicas

|                                             | TBARS-cortex<br>(nmol TMP.<br>mg proteína <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup> | SH-cortex<br>(μmol SH. mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) | TBARS-fígado<br>(nmol TMP.<br>mg proteína <sup>-1</sup> ) | SH- fígado<br>(μmol SH. mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 1-Padrão (P) <sup>1</sup>                   | 1,11 ± 0,82 <sup>a</sup>                                               | 60,77 ± 8,65 <sup>a</sup>                             | 0,38 ± 0,17 <sup>a</sup>                                  | 110,09 ± 38,65 <sup>a</sup>                            |
| 2-Bebida (PB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 1,27 ± 0,49 <sup>a</sup>                                               | 62,16 ± 15,11 <sup>a</sup>                            | 0,42 ± 0,20 <sup>a</sup>                                  | 98,16 ± 25,50 <sup>a</sup>                             |
| 3 -Bebida (PB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup> | 1,14 ± 0,65 <sup>a</sup>                                               | 58,15 ± 19,37 <sup>a</sup>                            | 0,33 ± 0,11 <sup>a</sup>                                  | 98,14 ± 14,73 <sup>a</sup>                             |
| 4 -Bebida(PB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup>  | 1,59 ± 0,80 <sup>a</sup>                                               | 54,68 ± 2,64 <sup>a</sup>                             | 0,25 ± 0,10 <sup>a</sup>                                  | 95,48 ± 13,42 <sup>a</sup>                             |
| 5 -Bebida (PB <sup>M-2</sup> ) <sup>5</sup> | 1,12 ± 0,42 <sup>a</sup>                                               | 48,41 ± 15,62 <sup>a</sup>                            | 0,18 ± 0,12 <sup>a</sup>                                  | 91,69 ± 12,37 <sup>a</sup>                             |

Os valores representam as médias de 6 repetições ± desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade (p<0,05); <sup>1</sup> dieta padrão (AIN-93M); <sup>2</sup> PB<sup>A-1</sup> (AIN-93M + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>3</sup> PB<sup>A-2</sup> (AIN-93M+ 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v); <sup>4</sup> PB<sup>M-1</sup> (AIN-93M+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>5</sup> PB<sup>M-2</sup> (AIN-93M+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

Analisando a tabela 3.11 observa-se que houve diferença significativa (p<0,05), entre o grupo colesterol e os tratamentos bebida com dieta hipercolesterolêmica para as determinações de TBARS e SH total.

**Tabela 3.11** – Dano oxidativo em lipídeos (TBARS) e conteúdo Sulfidril Total (SH) dos ratos machos *Wistar/UFPel*, alimentados durante 30 dias com as dietas hipercolesterolêmicas

|                                              | TBARS-cortex<br>(nmol TMP.<br>mg proteína <sup>-1</sup> ) | SH-cortex<br>(μmol SH. mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) | TBARS-fígado<br>(nmol TMP. mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) | SH- fígado<br>(μmol SH. mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 1-Colesterol (C) <sup>1</sup>                | 1,89 ± 0,65 <sup>a</sup>                                  | 64,73 ± 7,61 <sup>a</sup>                             | 0,84 ± 0,28 <sup>a</sup>                                  | 123,04 ± 19,70 <sup>a</sup>                            |
| 2 –Bebida (CB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 0,63 ± 0,06 <sup>b</sup>                                  | 58,47 ± 12,07 <sup>a</sup>                            | 0,54 ± 0,22 <sup>b</sup>                                  | 120,44 ± 22,37 <sup>a</sup>                            |
| 3 –Bebida (CB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup>  | 0,64 ± 0,18 <sup>b</sup>                                  | 53,98 ± 14,89 <sup>a,b</sup>                          | 0,46 ± 0,11 <sup>b</sup>                                  | 115,77 ± 9,80 <sup>a</sup>                             |
| 4 –Bebida (CB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup>  | 1,07 ± 0,81 <sup>b</sup>                                  | 58,71 ± 18,78 <sup>a</sup>                            | 0,25 ± 0,10 <sup>b</sup>                                  | 116,48 ± 28,02 <sup>a</sup>                            |
| 5 –Bebida (CB <sup>Mb-2</sup> ) <sup>5</sup> | 0,78 ± 0,30 <sup>b</sup>                                  | 41,11 ± 9,59 <sup>b</sup>                             | 0,18 ± 0,12 <sup>b</sup>                                  | 115,42 ± 27,54 <sup>a</sup>                            |

Os valores representam as médias de 6 repetições ± desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade (p<0,05); <sup>1</sup> Colesterol(C) (AIN-93M acrescida de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol cristalino (p/p)); <sup>2</sup> CB<sup>A-1</sup> (Colesterol + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>3</sup> CB<sup>A-2</sup> (Colesterol+ 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v); <sup>4</sup> CB<sup>M-1</sup> (Colesterol+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>5</sup> CB<sup>Mb-2</sup> (Colesterol+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

Pelas avaliações de peroxidação lipídica (TBARS), tanto no cortex quanto no fígado, foi possível verificar o efeito antioxidante da polpa de amora-preta e de mirtilo, onde ocorreram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre o tratamento controle (com colesterol) com os tratamentos em que foi adicionado as polpas diluídas dos frutos na dieta hipercolesterolêmica.

Um dos fatores relacionados à maior facilidade na determinação dos produtos da oxidação no cérebro, se deve por ser um dos órgãos mais susceptíveis ao dano oxidativo, principalmente em função da alta concentração de oxigênio, e dos altos níveis de lipídeos insaturados e de metais de transição (como ferro) presentes, além de ser um órgão com grande deficiência de mecanismos de defesa antioxidante (REITER, 1995).

O efeito antioxidante evidenciado no cérebro foi relacionado com a presença de compostos fenólicos. Heo & Lee (2004) descrevem que o efeito protetor de quercetina foi superior ao da vitamina C, ao prevenir o efeito de redução da glutathione e proteger o cérebro do estresse oxidativo induzido por neurotoxicidade, devido às propriedades estruturais e benefícios fisiológicos da quercetina. Como a permeabilidade cerebral é controlada por características psicoquímicas, como hidrofobicidade ou lipofilicidade, a quercetina pode entrar em regiões cerebrais beneficiando-se de funções antioxidantes e biológicas, que protegem da citotoxicidade induzida por radicais livres.

Pouco é conhecido sobre a absorção, biodistribuição e metabolismo dos flavonóides, em concentrações normalmente ingeridas na dieta (cerca de 60 a 106 mg.dia<sup>-1</sup> no que concerne à população brasileira) (ARABBI; et al., 2004). Estudo demonstrou que menos de 1% da quercetina é absorvido no intestino, sendo que mais de 50% da dose ingerida é degradada pela microbiota colônica, enquanto o restante é eliminado pelas fezes restando apenas um percentual muito pequeno para atuar na proteção dos diversos órgãos do organismo (DESCHNER, 1992).

A redução da peroxidação lipídica, através da medida de TBARS, tem sido bastante utilizada para medir o potencial antioxidante de dietas contendo compostos fenólicos (LEITÃO, 2012). Em estudos com uva, extratos de resíduos da vinificação, suco de amora e chalconas (1,3-diaril-2-propen-1-onas), também foram observados reduções na incidência da peroxidação, ou seja, uma redução no conteúdo de TBARS, indicando que essas substâncias apresentam capacidade antioxidante (ARAÚJO, 2009; LEITÃO 2012).



Leitão (2012), em estudos com suco de uva administrado em ratos *Wistar*, identificou redução nos níveis de tióis reduzidos, sendo que sua atividade foi maior no fígado, córtex cerebral e no plasma dos animais, respectivamente, não sendo identificada no sangue. No presente estudo foi observado uma redução significativa nos níveis de tióis reduzidos, em relação a dieta padrão, apenas no córtex cerebral dos ratos que ingeriram polpa de mirtilo a 75%, não apresentando diferença significativa no fígado entre os diferentes grupos de animais.

### **3.6. POTENCIAL ANTIOXIDANTE TOTAL NÃO ENZIMÁTICO (TRAP) NO CÓRTEX CEREBRAL E FÍGADO**

Pelos dados da tabela 3.12 observa-se que não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), entre o tratamento padrão com os tratamentos nos quais ocorreram a adição de polpas de amora-preta e mirtilo, nas dietas normolipídicas, nas determinações do potencial antioxidante total (TRAP) no córtex cerebral. No entanto, comportamento diferenciado foi observado no fígado, onde ocorreu uma diferença significativa entre o tratamento padrão com o tratamento em que foi adicionado polpa de mirtilo a 75%. Nos ratos alimentados com a dieta com mirtilo (PB<sup>M-2</sup>) apresentaram uma redução da capacidade antioxidante total, evidenciando que a polpa do mirtilo, na concentração deste estudo, proporcionou uma ação positiva, em relação ao padrão, na capacidade antioxidante total.

A mesma tendência foi observada com a dieta hipercolesterolêmica (Tabela 3.13).

Para análise da TRAP, o grupo de animais expostos à dieta hipercolesterolêmica mostrou valores maiores em relação aos grupos hipercolesterolêmicos com ingestão de polpa de frutas, revelando diminuição da capacidade antioxidante, no fígado dos animais. Com base nesses resultados pode-se inferir que os componentes antioxidantes da polpa de amora-preta e mirtilo, foram absorvidos pelo organismo dos animais e reduziram os danos ocasionados pela ingestão hiperlipídica. Segundo Moura (2009), os compostos fenólicos demonstram ação antioxidante *in vivo*, reduzindo a peroxidação lipídica e restauram a capacidade antioxidante em ratos adultos. Estudos de Garcia-Alonso et al. (2004) atribuem à capacidade antioxidante das frutas vermelhas, aos flavonoides, em especial, aos

antocianos, os quais têm demonstrado agirem como quelantes do oxigênio singlete e triplete, sequestrantes de radicais livres e inibidores enzimáticos.

**Tabela 3.12** – Capacidade antioxidante total (TRAP) em ratos machos *Wistar*/UFPel, alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais normolipídicas

|                                             | TRAP-cortex<br>(% de radicais<br>formados) | TRAP-fígado<br>(% de radicais<br>formados) |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1-Padrão (P) <sup>1</sup>                   | 60,82 ± 7,74 <sup>a</sup>                  | 55,28 ± 1,91 <sup>a</sup>                  |
| 2-Bebida (PB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 59,13 ± 6,18 <sup>a</sup>                  | 54,85 ± 3,69 <sup>a,b</sup>                |
| 3 -Bebida (PB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup> | 58,59 ± 3,23 <sup>a</sup>                  | 53,86 ± 3,97 <sup>a,b</sup>                |
| 4 -Bebida (PB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup> | 59,17 ± 5,62 <sup>a</sup>                  | 53,89 ± 1,57 <sup>a,b</sup>                |
| 5 -Bebida (PB <sup>M-2</sup> ) <sup>5</sup> | 61,51 ± 4,62 <sup>a</sup>                  | 51,14 ± 3,27 <sup>b</sup>                  |

Os valores representam as médias de 6 repetições ± desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade (p\_0,05); <sup>1</sup> dieta padrão (AIN-93M); <sup>2</sup> PB<sup>A-1</sup> (AIN-93M + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>3</sup> PB<sup>A-2</sup> (AIN-93M + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v); <sup>4</sup> PB<sup>M-1</sup> (AIN-93M + 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>5</sup> PB<sup>M-2</sup> (AIN-93M + 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

**Tabela 3.13** – Capacidade antioxidante total (% de radicais formados) em ratos machos *Wistar*/UFPel, alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais hipercolesterolêmicas

|                                              | TRAP-cortex<br>(% de radicais<br>formados) | TRAP-fígado<br>(% de radicais<br>formados) |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1-Colesterol (C) <sup>1</sup>                | 58,84 ± 4,71 <sup>a</sup>                  | 57,43 ± 1,39 <sup>a</sup>                  |
| 2 –Bebida (CB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 60,93 ± 3,63 <sup>a</sup>                  | 54,84 ± 3,04 <sup>a,b</sup>                |
| 3 –Bebida (CB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup>  | 63,39 ± 5,68 <sup>a</sup>                  | 52,24 ± 3,29 <sup>b</sup>                  |
| 4 –Bebida (CB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup>  | 61,15 ± 6,94 <sup>a</sup>                  | 53,06 ± 3,26 <sup>b</sup>                  |
| 5 –Bebida (CB <sup>Mb-2</sup> ) <sup>5</sup> | 57,74 ± 5,14 <sup>a</sup>                  | 52,41 ± 2,45 <sup>b</sup>                  |

Os valores representam as médias de 6 repetições ± desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade (p ≤ 0,05); <sup>1</sup> Colesterol (C) (AIN-93M acrescida de 0,1% de ácido cítrico e 1% de colesterol cristalino (p/p)); <sup>2</sup> CB<sup>A-1</sup> (Colesterol + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>3</sup> CB<sup>A-2</sup> (Colesterol + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v); <sup>4</sup> CB<sup>M-1</sup> (Colesterol + 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>5</sup> CB<sup>Mb-2</sup> (Colesterol + 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

### 3.7. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA SUPERÓXIDO-DISMUTASE (SOD) E CATALASE (CAT) NO CÓRTEX CEREBRAL E NO FÍGADO

Os valores médios das determinações das atividades enzimáticas da superóxido-dismutase (SOD) e da catase (CAT) no córtex cerebral e fígado de ratos Wistar, submetidos a dietas normolipídica e hipercolesterolêmica estão expostos nas tabelas 3.14 e 3.15.

**Tabela 3.14** – Atividades enzimáticas da Superóxido-dismutase (SOD) e Catalase (CAT) no córtex cerebral e no fígado dos ratos machos *Wistar*/UFPel, alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais normolipídicas

|                                             | CAT- cortex<br>(unidade<br>CAT. mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) | SOD -<br>cortex (uni-<br>dade SOD.<br>mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) | CAT-<br>fígado (unidade<br>CAT. mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) | SOD – fígado<br>(unidade<br>SOD. mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1-Padrão (P) <sup>1</sup>                   | 2,25 ± 0,35 <sup>a</sup>                                       | 40,91 ± 2,22 <sup>a</sup>                                            | 161,51 ± 43,21 <sup>b</sup>                                    | 170,51 ± 52,94 <sup>a</sup>                                     |
| 2-Bebida (PB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 2,08 ± 1,02 <sup>a</sup>                                       | 40,11 ± 3,01 <sup>a</sup>                                            | 166,75 ± 36,25 <sup>b</sup>                                    | 156,76 ± 68,11 <sup>a</sup>                                     |
| 3 -Bebida (PB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup> | 2,56 ± 0,50 <sup>a</sup>                                       | 41,12 ± 2,94 <sup>a</sup>                                            | 168,47 ± 64,01 <sup>b</sup>                                    | 157,24 ± 27,48 <sup>a</sup>                                     |
| 4 -Bebida (PB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup> | 2,40 ± 0,97 <sup>a</sup>                                       | 40,04 ± 1,81 <sup>a</sup>                                            | 201,38 ± 24,16 <sup>a,b</sup>                                  | 164,14 ± 55,94 <sup>a</sup>                                     |
| 5 -Bebida (PB <sup>M-2</sup> ) <sup>5</sup> | 2,78 ± 0,81 <sup>a</sup>                                       | 40,25 ± 1,22 <sup>a</sup>                                            | 235,28 ± 58,54 <sup>a</sup>                                    | 166,19 ± 49,83 <sup>a</sup>                                     |

Os valores representam as médias de 6 repetições ± desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade (p\_0,05); <sup>1</sup> dieta padrão (AIN-93M); <sup>2</sup> PB<sup>A-1</sup> (AIN-93M + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>3</sup> PB<sup>A-2</sup> (AIN-93M+ 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v); <sup>4</sup> PB<sup>M-1</sup> (AIN-93M+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>5</sup> PB<sup>M-2</sup> (AIN-93M+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

Constatou-se que apenas nos fígados dos animais que ingeriram polpa de mirtilo a 75% (PB<sup>M-2</sup>) ocorreu um aumento significativo nos níveis da atividade da catalase (CAT), quando comparados com o padrão (P), na dieta normolipídica. Rodrigues et al. (2003), utilizando 12 ratos em estudo para avaliar o efeito do flavanóide rutina, observaram uma elevação significativa na enzima antioxidante SOD. Meirelles (2011), em estudo com suplementação de suco de mirtilo em ciclistas treinados, também observou um aumento significativo no grupo suplementado com mirtilo, apenas na atividade da enzima catalase sérica, no pré exercício.

Observou-se que ocorreu um aumento enzimático significativo na expressão da catalase nos tecidos do córtex cerebral e hepáticos, nos ratos que foram alimentados com dieta hipercolesterolêmica concomitantemente com a ingesta de

polpa das frutas vermelhas (amora-preta e mirtilo), exceto para a dieta com polpa de amora-preta a 50%, diferindo dos ratos que somente consumiram a dieta controle (C). Leitão (2012) evidenciou a ação das enzimas de defesas antioxidantes avaliadas no córtex cerebral, fígado e sangue, de ratos *Wistar* machos, que consumiram suco de uva. Estes dados suportam a hipótese de que dietas ricas em colesterol e pobres em antioxidantes contribuem para um aumento da lipoperoxidação, exarcebando as espécies reativas de oxigênio, conseqüentemente inibindo a atividade das enzimas antioxidantes (ISHIMOTO, 2008).

**Tabela 3.15** – Atividades enzimáticas da Superóxido-Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) no córtex cerebral e no fígado dos ratos machos *Wistar*/UFPel, alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais hipercolesterolêmicas

|                                              | CAT- cortex<br>(unidade<br>CAT. mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) | SOD -<br>cortex(unida<br>de SOD. mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) | CAT-<br>fígado(unidade<br>CAT. mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) | SOD – fígado<br>(unidade SOD.<br>mg proteína <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 1–Colesterol (C) <sup>1</sup>                | 1,17 ± 0,54 <sup>b</sup>                                       | 38,41 ± 2,12 <sup>a</sup>                                       | 141,66 ± 28,91 <sup>c</sup>                                   | 139,16 ± 33,97 <sup>a</sup>                                  |
| 2 –Bebida (CB <sup>A-1</sup> ) <sup>2</sup>  | 2,41 ± 0,58 <sup>a</sup>                                       | 39,79 ± 1,95 <sup>a</sup>                                       | 150,69±26,33 <sup>b,c</sup>                                   | 179,16 ± 33,97 <sup>a</sup>                                  |
| 3 –Bebida (CB <sup>A-2</sup> ) <sup>3</sup>  | 2,71± 0,50 <sup>a</sup>                                        | 39,91 ± 7,49 <sup>a</sup>                                       | 202,29± 42,79 <sup>a</sup>                                    | 174,02± 26,02 <sup>a</sup>                                   |
| 4 –Bebida (CB <sup>M-1</sup> ) <sup>4</sup>  | 2,06 ± 0,73 <sup>a</sup>                                       | 38,22 ± 4,79 <sup>a</sup>                                       | 188,92± 43,05 <sup>a,b</sup>                                  | 172,82± 65,54 <sup>a</sup>                                   |
| 5 –Bebida (CB <sup>Mb-2</sup> ) <sup>5</sup> | 2,10 ± 0, 41 <sup>a</sup>                                      | 37,25± 2,23 <sup>a</sup>                                        | 205,29± 37,36 <sup>a</sup>                                    | 181,52± 51,89 <sup>a</sup>                                   |

Os valores representam as médias de 6 repetições ± desvio padrão; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ); <sup>1</sup> Colesterol(C) (AIN-93M acrescida de 0,1% de ácido cólico e 1% de colesterol cristalino (p/p)); <sup>2</sup>CB<sup>A-1</sup>(Colesterol + 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>3</sup>CB<sup>A-2</sup>(Colesterol+ 5mL de suco amora-preta na diluição de proporções de 75% p/v); <sup>4</sup>CB<sup>M-1</sup>(Colesterol+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 50% p/v); <sup>5</sup>CB<sup>Mb-2</sup>(Colesterol+ 5mL de suco mirtilo na diluição de proporções de 75% p/v).

Ishimoto (2008), em pesquisa com extratos de resíduos de vinhos, observou que não houve grandes diferenças na atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathionaperoxidase, porém observou uma tendência de aumento na atividade das mesmas. Este resultado levou o autor a inferir que a concentração dos compostos fenólicos (potentes antioxidantes) presentes nos extratos fossem os responsáveis por este aumento, tendo em vista que os extratos com maior concentração em compostos fenólicos foram os que se diferenciaram. Outros pesquisadores comprovaram o aumento da atividade enzimática em modelo animal (roedores), utilizando sucos da uva ou de outros vegetais, os quais são ricos em antioxidantes (MARTINELLO, 2006; ISHIMOTO, 2008).

#### 4.0 CONCLUSÕES

Polpas de amora-preta (*Rubus ssp.*) e de mirtilo (*Vaccinium sp.*) adicionadas em dietas experimentais apresentaram diferenças aos efeitos biológicos em ratos Wistar.

A polpa de mirtilo nas dietas foi eficaz na redução do consumo alimentar e na perda de peso em ratos submetidos a uma dieta normolipídica.

A polpa de mirtilo em dietas hipercolesterolêmicas, promoveu maior excreção de lipídeos fecais, menor acúmulo de lipídeos hepáticos, e proporcionou fígados com menores pesos e com coloração vermelha intenso em ratos Wistar.

Ocorreu uma redução significativa, no grupo de 75% de amora-preta e 75% de mirtilo, nos níveis de triacilglicerol hepático nos animais que ingeriram polpas de ambas as frutas.

A polpa de mirtilo adicionada à dieta apresentou efeito redutor sobre os níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol total, colesterol-LDL e colesterol-VLDL, em ratos Wistar, tanto na dieta normolipídica quanto na hipercolesterolêmica. Do mesmo modo, a adição de polpas de amora-preta e de mirtilo nas dietas foram capazes de reduzir a iniciação das reações de peroxidação lipídica, comprovando seu potencial antioxidante em sistemas *in vivo*, nos tecidos do córtex cerebral e hepáticos de ratos wistar.

#### 4.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como regra geral observou-se, o consumo de dieta com polpa de mirtilo na proporção de 75%, induziu melhores resultados nas avaliações dos diferentes parâmetros estudados em ratos Wistar.

Resultados similares foram observados no grupo de animais alimentados com rações contendo amora-preta a 75% e com polpa de mirtilo a 50%; e resultados menos expressivos foram observados no grupo de animais que consumiram dieta com polpa de amora-preta a 50%.

Relacionando o conteúdo de fitoquímicos das polpas (capítulo II), observa-se que a polpa de mirtilo a 75% apresenta maior conteúdo total de fenóis, de antocianinas e de ácido L-ascórbico, que as polpas de mirtilo a 50% e das polpas de amora-preta a 50% e 75%.

As polpas de mirtilo a 50% apresentaram conteúdos destes fitoquímicos muito similares às polpas de amora-preta a 75%; e as polpas de amora-preta a 50% apresentaram conteúdos inferiores às demais.

No entanto, ambas as polpas de mirtilo apresentaram conteúdos inferiores de ácido L-ascórbico e de tocoferóis, que ambas as polpas de amora-preta.

Com isto, pode-se induzir que os melhores efeitos apresentados em ratos que consumiram dietas com polpa de mirtilo e amora-preta estão relacionados aos maiores conteúdos do total de compostos fenólicos, antociânicos e de ácido L-ascórbico.

## 5.0 REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICOS

1. AEBI, H.; LESTER, P.. Catalise in vitro. **Methods in Enzymology**- Academic Press, v. 105, p. 121-126, 1984.
2. ARABBI, P.R.; GENOVESE, N.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetables foods
3. ARAÚJO, P.F. **Atividade antioxidante de néctar de amora-preta (*Rubus* spp.) e sua influência sobre os lipídios séricos, glicose sanguínea e peroxidação lipídica em hamsters (*Mesocricetus auratus*) hipercolesterolêmicos**. 2009. 123f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.
4. BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian J. of Biochem. and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959
5. CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Guide to the care and use of experimental animals. Vol 1, n.2a, p.298, 1993.
6. CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP. Parâmetros bioquímicos de ratos do centro de bioterismo da FMUSP, 2008. Disponível em: [HTTP://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id\\_ani=17&parametros=sim](http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id_ani=17&parametros=sim). Acessado em 12/05/2010.
7. CHANANDIRI T, SANIKIDZE T, ESAISHVILI M, CHKHIKVISLI I, DATUNASHVILI I. **Effectiveness of green tea catechines for the correction of the alimentary obesity in the experiment**. **Inst of Medical Biotechn, Georgian Academy of Scien**. v. 61 n. 3 p. 126, 2005.
8. CHEREM, A.R.; TRAMONTE, V.L.C.G.; FETT, R.; van DOKKUM, W. Efeito da casca da berinjela (*Solanum melongena*) sobre as concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total e frações lipídicas em cobaias (*Cavia porcellus*) hiperlipidêmicos. **Rev. Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.9, n.1, p.51-60, 2007.
9. COFFY, S.P. **Nível sérico de NO e TBA-RS em ratos Wistar submetidos à dieta hipercolesterolêmica tratados com extratos de diferentes espécies de *Vaccinium myrtillus***. 2008. 25f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Universidade regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim. commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **J. of Agric. and Food Chemistry**, v.52, n.5, p.1124-31, 2004.

10. DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Revista Acta Sci Health Sci*. v.28,n.2,p.165-170,2006.
11. DE LUCA, R. R., ALEXANDRE, S. R., MARQUES, T. **Manual para técnicos em bioterismo**. São Paulo: Winner Graph, 259p. 1996.
12. DESCHNER, E.E. Dietary quercetin and rutin: Inhibitors of experimental colonic neoplasia. In: **Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II** Huang, M., Ho, C. and Lee, C. ACS, Washington, p. 265-268, 1992..
13. ELLMAN, G.L. Tissue sulphydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys**, n. 82, p. 70-77. 1959.
14. ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K.H., Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in*. 1990
15. FARIAS ES, GUERRA-JUNIOR G, PETROSKI EL. Estado nutricional de escolares em Porto Velho, Rondônia. **Rev Nutr**; v.21: p.401-9, 2008.
16. FORMAN, M. R., HURSTING, S. D., UMAR, A. and BARRET, J. C. Nutrition and cancer prevention: a multidisciplinary perspective on human trials. **Annual Rev. of Nutrition**, v. 24, p.223-254, 2004.
17. GARCÍA-ALONSO, M.; PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVASGONZALO, J.C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry**, v.84, p.13-18, 2004.
18. GHISELLI, A., SERAFINI, M., NATELLA, F., SCACCINI, C., Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology & Medicine** 29, 1106–1114.2000.
19. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 2007
20. HAUG, A.; HOSTMARK, A. T. Lipoprotein lipases, lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish oil or coconut oil. **The J. of Nutrition**, v. 117, n. 6, p. 1011-1017, 1987.
21. HELBIG E., **Efeitos do teor de amilose e da parboilização do arroz na formação do Amido resistente e nos níveis glicêmico e lipêmico de ratos wistar**. 2007. Tese(Doutorado em Ciências e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.



22. HEO, H.J.; LEE, C.Y. Protective effects of quercetin and vitamina C against oxidative stress-induced neurodegeneration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.25, p.7514-7517, 2004.

23. HO, H.M.; LEUNG, L.K.; CHAN, F.L.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Soy leaf lowers the ratio of non-HDL to HDL cholesterol in hamsters. **J.of Agric. and Food Chem**,v.51, p.4554-4558, 2003.

24. ISHIMOTO, E. Y.. **Efeito hipolipemiante e antioxidante de subprodutos de uva em hamsters**. 2008. 195f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Publica, Universudade São Paulo, São Paulo- SP.

25. JENNINGS, C. D.; BOLEYN, K. ; BRIDGES,S.R.; WOOD, P. J. ANDERSON, J. W. A comparison of the lipid lowering and intestinal morphological effects of cholestyramine, chitosan and oat gum in rats. **Proceed Society Experimental Biology Medical**, v. 189, p. 13-20, 1988

26. KAISU, R.; JAAKOLA, L.; KÄRENLAMPI, S.; HOHTOLA, A.Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and ‘northblue’ blueberry (*Vacciniumcorymbosumx V. Angustifolium*).**Food Chemistry**, Barking,v. 110, n. 1, p. 156-160, 2008.

27. KLAMT, F., et al., Time-related increase in mitochondrial superoxide production, biomolecule damage and antioxidant enzyme activities in **cortical astrocyte cultures**. **NeuroReport**, v.13, n.12, p.1515–1518, 2002.

28. LAMARÃO, R. & FIALHO, E.. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Rev.. Nutrição**. v. 22, n.2 p. 257-269., 2009.

29. LEITÃO, Angelita Machado. **Alterações na composição, no potencial antioxidante e nas propriedades biológicas do suco produzido com uvas, cv. Bordô, tratadas com radiação UV-C**. 2012. 85 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

30. LOTTENBERG, A.M. P.. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arq Bras Endocrinol Metab** vol.53, n.5, p. 595-607., 2009.

31. LOWRY, O.H.; ROSEBOUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol Chem**, v.193, p. 265–275, 1951.

32. MACHADO, D.F.; FERREIRA, C.L.L.; COSTA, N.M.B.; OLIVEIRA, T.T. Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido cólico. **Ciênc e Tecn. de Alimentos**, v.23, n.2, p.270-275, 2003.
33. MARTINELLO, F. **Avaliação da atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Tamarindus indica* L. sobre o metabolismo lipídico e na carcinogênese colorectal em hamster**. 2006. 148f. Tese (Doutorado em Biociência aplicada a Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP.
34. MEI, N. (1992). Intestinal chemosensitivity. In G. E. Holle & J. D. Wood(Eds.), *Advances in the innervation of the gastrointestinal tract*. Amsterdam, **The Netherlands: Elsevier**. p. 273–281, 1992
35. MEIRELLES, P.C. **Efeitos da suplementação de suco de mirtilo e exercício físico em marcadores de estresse oxidativo em indivíduos treinados**. 2011. 83f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Educação Física, na Área de Concentração em Atividade Física, Saúde e Desempenho. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
36. MOLAN et al. Satiety in rats following blueberry extract consumption induced by appetite-suppressing mechanisms unrelated to in vitro or in vivo antioxidant capacity. **Food Chem.**, v. 107, p. 1039–1044, 2008
37. MOURA, G. B. **Vinho tinto, suco de uva e etanol em ratos adultos submetidos a dietas hiperlipidêmica**. 2009. 56f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –Centro de Ciência Rural, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS
38. OLIVEIRA, T.T. de; GOMES, S.M.; NAGEM, T.J.; COSTA, N.M.B.; SECOM, P.R. Efeito de diferentes doses de flavonóides em ratos hiperlipidêmicos. **Rev. de Nutrição**, v.15, n.1, p.45-51, 2002.
39. PIENIZ, S. et al. Avaliação in vitro do potencial antioxidante de frutas e hortaliças. **Ciênc. agrotec.**, vol.33, n.2, pp. 552-559, 2009.
40. RASEIRA, M.C.; ANTUNES, L.E. Aspectos técnicos da cultura da amora-preta. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, 2004. 54p.
41. REDDY JK & RAO MS. (2006). "Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation". **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**n.5, p.290, 2006

42. REEVES, P.G.P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.N. AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the formulation of the AIN-76. **Rodent diet. Nutrition.** v. 123:n.11, p. 467-72; 1993.
43. REITER, R.J. Oxidative processes and oxidative defense mechanism in the aging brain. **FASEB Journal**, v.9, p.526-533, 1995.
44. RIBEIRO, J.N.; OLIVEIRA, T.T. de; NAGEM, T.J.; FLORES, A.V. Avaliação da toxicidade da antocianina de uva, através da quantificação espectrofotométrica de constituintes do sangue e medida de massa corporal de coelhos saudáveis. **Rev. Analytica**, n.12, p.50-55, 2004.
45. RODRIGUES, R. da S. **Caracterização de extratos de soja obtidos de grãos, farinha integral e isolado protéico visando a formulação e avaliação biológica(em coelhos) de bebida funcional à base de soja e polpa de pêssego.** 2003. 177f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
46. SAKAKIBARA, H., et al.,. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. **J. Agric. Food Chem.,** v.51, p.571-581, 2003.
47. SHINICK, F. L.; INK, S. L.; MARLETT, J. A. Dose response to a dietary oat bran fraction in cholesterol – fed rats. **J. of Nutrition**, v.120, n.6, p 561-568,1990.
48. STATISTICA–STATSOFT, Inc. STATISTICA (software de análise de dados do sistema), aversão 7. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com). 2004.
49. STONER, G. D. et al. Cancer prevention with freeze-dried *berries* and berry components. **Semin Cancer Biol.** v. 17, n. 5, p. 403-10; 2007.
50. ST-ONGE, M. P. (2005). Dietary fats, teas, dairy, and nuts: Potential functional foods for weight control? *American J. of Clinical Nut.*, v.81, p.7–15, 2005
51. TSENG, T.et al. Promotion of colon carcinogenesis through increasing lipid peroxidation induced in rats by a high cholesterol diet. *Cancer Letters*, Amsterdam, v. 100, p. 81-87, 1996.
52. WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.** v. 77, p. 325–333, 1981.
53. YAMAMOTO, Y.; et al. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. **The J. of Nutrit. Biochem.,** New York, v. 10, n.2, p.13-18, 1999.

54. YANG, T.T.C.; KOO M.W.L. Hypcholesterolemic effects of chinese tea. Hong Kong. **Pharmac. Research**, Vol. 35, No. 6, 1997.

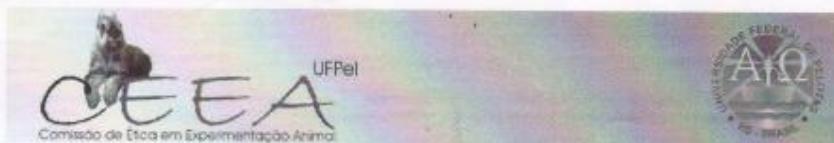
55. ZHANG, Z.; et. al. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts. **J. Agric. Food Chem**, v.52, n.4, p.688-691, 2004.

56. ZIMMERMANN, A. L. **Potencial antioxidante de extratos de cevada em ratos submetidos à dieta hipercolesterolêmica**. 2010. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade de Santa Maria, Santa Maria-RS.

# ANEXOS

## ANEXO 01

Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA – UFPEI), em reunião realizada no dia 07 de maio de 2009.



Pelotas, 07 de maio de 2009.

**De:** Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino  
Pres. da Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEAA)

**Para:** Prof. Dr. Rui Zambiasi  
Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Senhor Professor:

A CEEAA analisou o projeto de pesquisa intitulado “**Poder antioxidante de extratos de amora-preta (*Rubus sp.*) e de mirtilo (*Vaccinium sp.*) em ratos wistar**”, processo nº 23110.000491/2009-93 sendo de parecer FAVORÁVEL a sua execução considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos que após tomar conhecimento do parecer reenviar o processo à CEEAA.

OBS: Informamos que duas cópias deste parecer estão anexadas ao processo. Uma cópia destinada ao coordenador do projeto e a outra deverá permanecer junto ao mesmo.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino  
Presidente da CEEAA