

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
Agroindustrial

Tese



Amora-preta (*Rubus fruticosus*): Compostos bioativos e voláteis

Andressa Carolina Jacques
Engenheira de Alimentos
Mestre em Ciências

Pelotas, 13 de janeiro de 2012

ANDRESSA CAROLINA JACQUES
Engenheira de Alimentos
Mestre em Ciências

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Orientador: Prof. PhD. Rui Carlos Zambiasi (CCQFA-UFPEL)
Co-Orientador: Prof. Dr. Eliezer Gandra (CCQFA- UFPEL)

PELOTAS
Rio Grande do Sul – Brasil
Janeiro de 2012

Banca examinadora:

PROF. PhD. RUI CARLOS ZAMBIAZI (CCQFA/UFPEL) – ORIENTADOR

PROF. Dr. ELIEZER ÁVILA GANDRA (CCQFA/UFPEL) – CO-ORIENTADOR

PROF^a. DR^a. JOSIANE FREITAS CHIM (CCQFA/UFPEL)- BANCA

PROF. DR. FABRIZIO DA FONSECA BARBOSA(CCQFA/UFPEL)- BANCA

PROF^a. DR^a. MÁRCIA DE MELLO LUVIELMO (CCQFA/UFPEL)- BANCA



“Quem sabe o que está buscando e onde quer chegar,
encontra o caminho certo e o
jeito de caminhar.”
(Mário Quintana)

**À minha família
pelo amor incondicional, dedico.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de vida e sabedoria;

À minha família, que esteve e estará sempre do meu lado em todas as etapas da minha vida. Agradeço ao amor incondicional à minha mãe: Angela, meu pai Luis Fernando e meu irmão Jeferson.

Ao Ederson, meu marido que fez parte de toda trajetória, por tudo que me representa e pelo seu apoio e amor acima de tudo;

As minhas amigas (eternas Luluzinhas) que já foram homenageadas na minha dissertação, mas não teria como não colocar meu agradecimento na tese também!

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Pós-graduação;

Ao Professor Rui Carlos Zambiasi, pelo exemplo de professor no qual me espelho para seguir minha vida profissional que me orientou nessa longa trajetória de mestrado e doutorado sempre com a mesma paciência, confiança e amizade;

Ao meu co-orientador Dr. Eliezer Gandra e a profa Dr^a Miriam pela valiosa ajuda e paciência na parte microbiológica deste trabalho;

Ao Fabio Chaves, pela indispensável ajuda na quantificação dos compostos voláteis e pelas traduções;

À professora Dr^a Josiane Chim pelo apoio em todas as etapas desde o mestrado até a última conquista no Concurso Público, o meu muitíssimo obrigada!!;

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pelo constante incentivo;

Às gurias do laboratório de Cromatografia do DCTA, Cleo, Fabiana, Vanessa, Josi, Fran, Ana e Rose por todos os dias de harmoniosa convivência que tivemos e pela troca de experiências, o meu muito obrigada!;

Às estagiárias Fernanda Rickies e Suzane da Luz;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial ao Departamento de química pela possibilidade de realizar a análise dos compostos voláteis. Agradeço a Profa Dr^a Elina Caramão e a Márcia Brasil pela ajuda.

Por fim, agradeço ao Cnpq pelo apoio financeiro deste projeto.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
SUMÁRIO.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Pequenas frutas.....	4
2.2 Amora-preta	5
2.2.1 Agentes sanitizantes à base de cloro.....	7
2.3 Compostos voláteis.....	10
2.3.1 Cromatografia gasosa na determinação de compostos voláteis.....	11
2.3.2 Métodos de isolamento dos compostos voláteis.....	14
2.3.2.1 Extração com solvente.....	14
2.3.2.2 Microextração em fase sólida no modo headspace.....	16
3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
4. CAPÍTULO I. Fitoquímicos em amora-preta (<i>Rubus</i> spp).....	29
Phytochemicals in blackberry.....	29
Resumo.....	29
Abstract.....	29
1 Introdução.....	30
3 Fitoquímicos.....	34
3.1 Compostos fenólicos	35
3.2 Ácido Ascórbico.....	42
3.3 Tocoferóis.....	44
3.4 Carotenóides.....	45
4 Considerações Finais.....	46
Referências	47
5. CAPÍTULO II. Chromatographic analyses of bioactive and volatile organic compounds in southern Brazilian blackberry (<i>Rubus fruticosus</i>) fruit cv. Tupy	53
Abstract.....	53
Phenolic compounds.....	55
Carotenoids.....	56

<u>Tocopherols.....</u>	<u>57</u>
<u>L-Ascorbic acid.....</u>	<u>57</u>
<u>Headspace SPME.....</u>	<u>58</u>
<u>Solvent extraction.....</u>	<u>58</u>
<u>3. Results and Discussion.....</u>	<u>58</u>
<u>Bioactive compounds.....</u>	<u>58</u>
<u>Volatile organic compounds.....</u>	<u>59</u>
<u>References.....</u>	<u>67</u>
<u>6. CAPITULO III. Efeito da sanitização à base de cloro sobre microrganismos contaminantes e compostos bioativos na polpa de amora-preta (Rubus fruticosus).....</u>	<u>71</u>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição físico-química da amora-preta cultivar Tupy.....	6
Tabela 2: Aromas característicos de algumas classes de compostos químicos	10
Classe.....	10
Composto.....	10
Estruturas.....	10
Aroma caracteístico.....	10
Alcoóis.....	10
3-octanol.....	10
.....	10
Cogumelo.....	10
Aldeídos.....	10
Hexanal.....	10
.....	10
Fruta não amadurecida.....	10
Cetonas.....	10
2-heptanona.....	10

.....	10
Queijo blue cheese.....	10
Ácidos carboxílicos.....	10
Ácido 2-metilbutanóico.....	10
.....	10
Fruta doce.....	10
Ésteres.....	10
Acetato de etila.....	10
.....	10
Éter conhaque.....	10
Lactonas.....	11
γ -decalactona.....	11
.....	11
Creme de nozes, pêssego.....	11
Pirazina.....	11
2-acetilpirazina.....	11
.....	11
Pipoca.....	11
Compostos sulfurados.....	11
2-furfurilmetanotiol.....	11
.....	11
Café.....	11
Fonte : FRANCO, 2003; NOGUEIRA, 2002).....	11
Table 1. Content of bioactive compounds in blackberry cv. Tupy.....	59
Table 2. Volatile compounds identified in blackberry cv. Tupy.....	63
Table 3. Semivolatile compounds identified in blackberry cv. Tupy extracted with hexane.....	64
Table 4. Semivolatile compounds identified in blackberry cv. Tupy extracted with acetone.....	65
Tabela 2: Conteúdo de compostos fenólicos e de antocianinas na polpa de amora-preta cv. Tupy, submetidas em soluções sanitizantes a base de cloro.	79
Tabela 3: Conteúdo de Tocoferóis e de Ácido ascórbico na polpa de amora-preta cv. Tupy, submetida em soluções a base de cloro.....	80
δ –Tocoferol.....	80

(β + γ)-Tocoferol.....	80
α -Tocoferol.....	80
(α + β + γ + δ).....	80
Tabela 4: Conteúdo de carotenóides na polpa de amora-preta cv. Tupy, submetida em soluções sanitizantes a base de cloro.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Amora-preta cv. Tupy.....	6
Figura 3: Dispositivo de SPME comercializado pela Supelco.....	18
Figura 7: Esquema representativo da classificação dos revestimentos poliméricos comerciais para SPME.....	21
.....	36
Figura 1. Estrutura básica dos flavonóides.....	36
Figura 2. Estrutura geral da molécula de antocianina.....	37
Figura 3. Estrutura química do ácido gálico (a), ácido elágico (b) e ácido p-hidróxibenzóico (c).....	39
Figura 4. Estrutura química do ácido caféico (a) e do ácido p-cumárico (b).....	40
Figura 5. Estrutura química do trans resveratrol (a) e do cis-resveratrol (b).....	40
Figura 6. Oxi-redução do ácido L-ascórbico.....	42
Figura 7. α -tocoferol (a); β -tocoferol (b); γ -tocoferol (c); e δ - tocoferol (d).....	44
Figure 3. Total ion chromatogram of blackberry cv. Tupy volatiles extracted with acetone.....	66

RESUMO

JACQUES, Andressa C. **AMORA-PRETA (*Rubus fruticosus*): COMPOSTOS BIOATIVOS E VOLÁTEIS**. 2011. 87f. Tese (doutorado) - Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O Brasil é um dos principais países consumidores de frutas, ocupando a terceira posição mundial. A diversidade de frutas destinadas ao mercado é cada vez maior, mas suas propriedades e atividades não estão totalmente determinadas. Esta enorme diversidade de frutos representa uma área promissora para pesquisa sobre compostos bioativos e aqueles responsáveis pelo aroma característico, em razão de suas propriedades sensoriais, no entanto, os compostos responsáveis pelo aroma de muitos frutos ainda não foram identificados. Em face do exposto o objetivo deste trabalho foi o de identificar os principais compostos voláteis e bioativos presentes na amora-preta cv. Tupy e avaliar a influência do processo de sanitização à base de cloro sobre a estabilidade destes compostos após a elaboração de polpa de amora-preta. Pelos resultados observa-se que a única concentração que foi eficiente para manter os níveis de fungos de acordo com a legislação foi a imersão em solução de 200ppm de cloro/15 minutos, sendo que nesta concentração as perdas observadas para compostos fenólicos individuais, antocianinas, tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides individuais foram respectivamente: 56, 32, 37, 54 e 18%.

Palavras-chave: Amora-preta, bioativos, voláteis

ABSTRACT

JACQUES, Andressa C. **AMORA-PRETA (*Rubus fruticosus*): COMPOSTOS BIOATIVOS E VOLÁTEIS**. 2011. 87f. Tese (doutorado) - Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas

Brazil is a major consumer country of fruit, occupying the third position worldwide. The diversity of fruit for the market is growing, but its properties and activities are not fully determined. This huge diversity of fruits represents a promising area for research on bioactive compounds and those responsible for the characteristic aroma due to their sensory properties; however, the responsible compounds of aroma of many fruits have not yet been characterized. Against this background the aim of this study was to identify the main volatile and bioactive compounds in blackberry cv. Tupy, and evaluate the influence of the sanitization process based on chlorine on the stability of these compounds after the blackberry pulp processing. The results shown that the solution concentration of 200ppm of chloride for 15 min. was the only one that was efficient to reach the legislation levels for molds. In that concentration the losses of individual phenolics, anthocyanins, tocopherols and ascorbic acid was 56, 32, 37, 54 e 18% respectively.

Key-words: Blackberry, bioactives, volatiles

1 INTRODUÇÃO GERAL

O conhecimento da composição química dos alimentos consumidos no Brasil é fundamental para se avaliar a disponibilidade de nutrientes e o seu consumo por populações, além de verificar a adequação nutricional da dieta, identificar o estado nutricional, desenvolver pesquisas sobre as relações entre dieta e doença, no planejamento agropecuário e na indústria de alimentos. Entretanto, pelas suas dimensões continentais, nosso país possui ainda uma gama muito grande de alimentos, principalmente de origem vegetal, que ainda devem ser quimicamente melhor caracterizados (Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação, 2004).

Os compostos bioativos têm sido recentemente investigados cientificamente devido sua importância na promoção da saúde e prevenção de doenças. A associação de uma dieta rica em frutas e hortaliças e o decréscimo da incidência de várias doenças, têm sido consideradas como evidências epidemiológicas (GARCIA et al., 2004). Frutas e hortaliças são recomendadas na alimentação humana devido sua riqueza em substâncias com ação antioxidante, as quais exercem ação protetora contra a evolução de processos degenerativos que conduzem às doenças e ao envelhecimento precoce. Os antioxidantes obtidos da dieta, como a vitamina C, a vitamina E e compostos fenólicos, são extremamente importantes na intercepção destes radicais livres.

Publicações recentes relatam as propriedades de vários fitoquímicos, especialmente de compostos fenólicos presentes em frutas, os quais atuam com eficácia contra infecções causadas por *Helicobacter pylori* (Vatten et al., 2005) e na indução da apoptose (YEH E YEN, 2005; HEO & LEE, 2005; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Os compostos fenólicos perfazem um grupo de compostos heterogêneos de elevado peso molecular, os quais são resultantes do metabolismo secundário de vegetais (STRUBE et.al., 1993). Os compostos fenólicos de fontes vegetais podem ser classificados no grupo dos flavonóides e dos não flavonóides. Dentre os compostos fenólicos do grupo dos flavonóides se encontram as antocianinas. As antocianinas são pigmentos que conferem uma coloração que varia entre o laranja, vermelho e azul. Segundo Shahidi e Marian (2003), estudos recentes demonstram

que as antocianinas atuam como antioxidantes naturais, promovendo vários benefícios à saúde.

Além das antocianinas, os carotenóides também apresentam capacidade antioxidante, e de acordo com Azevedo-Meleiro & Rodriguez-Amaya (2004), a capacidade antioxidante, cor e a atividade biológica dos carotenóides estão intrinsicamente relacionados com sua estrutura molecular. O consumo de frutas e hortaliças com alto teor de carotenóides tem apresentado, também, relação inversa com o risco de desenvolvimento de câncer (KRINSKY, 1991; KRINSKY, 1989).

De acordo com Silva et al., (2006) o teor de fitoquímicos nas frutas pode variar dependendo da espécie, das condições edafoclimáticas, do estágio de maturação na época da colheita, de variações genéticas, do manuseio pós-colheita, das condições de estocagem e do tipo e condições do processamento. O conteúdo destes nutrientes no alimento *in natura* e de sua estabilidade após a colheita, podem influenciar a qualidade nutricional do alimento.

O Brasil possui uma diversidade natural de frutos, cultivados em condições climáticas diferentes, o que ocasiona diferentes aromas e sabores. Esta enorme diversidade de frutos representa uma área promissora para pesquisa sobre aromas, em razão de suas propriedades sensoriais incomuns, no entanto, o aroma de muitos frutos ainda não foi caracterizado.

O aroma determina a qualidade do produto e seu preço de mercado, evidenciando a importância do conhecimento das rotas bioquímicas de geração dos compostos voláteis, que são em grande parte responsáveis pelo aroma, durante o processamento (BASTOS et al., 2007).

A grande maioria dos compostos voláteis são oriundos dos compostos bioativos, os quais, além de suas propriedades benéficas à saúde humana, estão geralmente relacionados com os sistemas de defesa das plantas contra a radiação ultravioleta ou contra as agressões de insetos ou patógenos. Como existem em grande número, estas classes de compostos podem ser subdivididos em grupos com inúmeros compostos distintos (MANACH et al., 2004).

Os compostos orgânicos voláteis são sintetizados a partir de vários precursores, incluindo aminoácidos, lipídios e carotenoides; porém, enquanto algumas das vias de síntese são conhecidas, para a maioria dos compostos voláteis estas etapas metabólicas ainda permanecem desconhecidas (TIEMAN et al., 2006).

Um fator importante para a identificação dos compostos voláteis em frutas é a técnica de amostragem, sendo que alguns fatores podem afetar profundamente o perfil qualitativo e quantitativo. A microextração em fase sólida (SPME), consiste em uma técnica de adsorção/dessorção desenvolvida na Universidade de Waterloo (Ontario, Canadá), pela qual se elimina a necessidade de utilização de solventes orgânicos ou instrumentos complexos para a extração e concentração de compostos voláteis e não voláteis a partir de amostras líquidas ou gasosas. A extração fundamenta-se no equilíbrio de partição ou adsorção entre uma fibra apropriada (fase estacionária) e os componentes contidos na amostra ou no seu *headspace*. Quando o equilíbrio é alcançado, a quantidade de composto extraído está diretamente relacionada à afinidade com a fase estacionária da fibra e de sua concentração na amostra. Os compostos são posteriormente dessorvidos termicamente, separados, identificados e quantificados através de técnicas cromatográficas (ARTHUR et al., 1992; YANG & PAPPARD, 1994).

As pequenas frutas, especificamente a amora-preta, são importantes fontes de compostos fenólicos na dieta humana (Reyes-Carmona, 2005), porém a amora-preta apresenta estrutura frágil e alta atividade respiratória, com isso a conservação pós-colheita da amora-preta é relativamente curta e a elaboração de subprodutos pode ser uma alternativa viável para o aproveitamento dessa fruta. Assim, frutas e vegetais podem passar por diferentes formas de processamento, o que pode afetar a concentração e a biodisponibilidade dos fitoquímicos presentes nos produtos (VAN DER SLUIS et al., 2001).

O processamento de alimentos, que possui como objetivos principais o aumento da vida útil de um produto, tem um impacto na composição química e na atividade antioxidante de frutas e hortaliças, o que ainda é uma área pouco explorada e com poucas informações disponíveis.

Outro fator que pode influenciar o conteúdo destes compostos, é a desinfecção de frutas antes do seu preparo, o que consiste em uma prática comum na indústria de alimentos. De acordo com Pacheco et al., (2002), frutas e hortaliças são potenciais veiculadores de microrganismos que podem estar associados a toxinfecções alimentares e, conseqüentemente, a doenças transmitidas por alimentos (DTA). Inúmeras são as causas para a presença de elevada carga microbiana, entre as quais estão as técnicas de cultivo, armazenamento, transporte e distribuição para consumo, a prática do uso de adubo orgânico, a utilização de

águas contaminadas para irrigação, o transporte feito em engradados abertos e as condições de higiene no manuseio e preparo das refeições, principalmente quando os alimentos são consumidos crus (PACHECO et al., 2002).

Algumas técnicas para reduzir a carga microbiana têm sido estudadas já há algum tempo por pesquisadores da área de higiene de alimentos. Entre elas, destaca-se o uso de soluções desinfetantes a base de cloro, compostos de amônia quaternária e de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, o ácido láctico, entre outros. O cloro, em suas várias formas, especialmente na forma de sais de hipoclorito, é um dos sanitizantes empregado com maior sucesso nas indústrias de alimentos. São compostos eficientes e de baixo custo, tendo larga aplicação para o controle bacteriológico em indústrias de frutas e hortaliças (KIM et al., 1999).

Em face do exposto, o objetivo deste trabalho foi o de identificar os principais compostos voláteis e bioativos presentes na amora-preta cv. Tupy e avaliar a influência do processo de sanitização à base de cloro sobre a estabilidade destes compostos na elaboração de polpa de amora-preta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pequenas frutas

As pequenas frutas constituem uma fonte natural de substâncias que exercem ação bioativa. Extratos de várias frutas, como amora-preta, pitanga, groselha, mirtilo e framboesa, tem sido considerados eficazes no combate aos radicais livres (PANTELIDIS et al., 2006). Recentemente, devido a associação de pequenas frutas à propriedades bioativas, tais como elevados teores de substâncias antioxidantes e anti-cancerígenas, tem aumentado a demanda do consumo de frutas pela população, em busca da suplementação alimentar a partir da diversificação da dieta com base em frutas.

A designação de “pequenas frutas” ou *small fruit*, é utilizada na literatura internacional para referenciar diversas culturas, como a do morango, da amora-preta, da framboesa, da groselha, do mirtilo, dentre outras. De acordo com Pagot e Hoffmann (2003), o cultivo de pequenas frutas tem despertado a atenção, não

somente dos consumidores, mas o interesse por parte de produtores e comerciantes. De um modo geral, o cultivo destas espécies se caracteriza pelo baixo custo de implantação, custo de produção acessível aos pequenos produtores, retorno econômico, adaptação às condições sócio-econômicas e do ambiente local, exigência de mão-de-obra não qualificada, possibilidade de cultivo no sistema orgânico e demanda maior do que a oferta (POLTRONIERI, 2003).

Segundo Poltronieri (2003), o cultivo de pequenas frutas vem colaborando para a melhoria da qualidade de vida de muitas famílias do meio rural da região dos Campos de Cima da Serra, que abrange os municípios de Vacaria, Monte Alegre dos Campos, Bom Jesus, Cambará do Sul, Jaquirana, São Francisco de Paula e São José dos Ausentes, e poderá, num futuro próximo, contribuir para o desenvolvimento desta região, principalmente em relação as propriedades de agricultores familiares descapitalizados.

Segundo Antunes (2002), dentre as várias opções destas espécies frutíferas com perspectivas de cultivo e comercialização, tem-se a amoreira-preta (*Rubus* sp) como uma das mais promissoras. A amora-preta é uma das espécies que tem apresentado sensível crescimento de área cultivada nos últimos anos no Rio Grande do Sul, sendo hoje o estado de maior produção nacional, com aproximadamente 700 ton.ano⁻¹; no entanto, a amoreira apresenta potencial de cultivo em outros estados de condições climáticas semelhantes às do Rio Grande do Sul.

2.2 Amora-preta

A amora-preta (*blackberry*) pertence ao gênero *Rubus* que contém, aproximadamente, 740 espécies subdivididas em 12 a 15 subgêneros (JENNINGS, 1988, *apud* DAUBENY, 1996). Esta frutífera possui porte ereto ou rasteiro, que produz frutos agregados, formado por minidrupas com cerca de quatro a sete gramas, de coloração negra e sabor ácido a doce-ácido. É uma planta rústica que apresenta baixo custo de produção, facilidade de manejo, requer pouca utilização de defensivos agrícolas, sendo, por isso, uma alternativa promissora para cultivo na agricultura familiar (MOTA, 2006).

O cultivo da amora-preta começou na segunda metade do século XIX nos Estados Unidos, onde é conhecida como *blackberry*. No Brasil, as primeiras culturas foram introduzidas em 1972, no Centro de Pesquisa da Embrapa Clima Temperado, localizada em Pelotas-RS. Esta cultura apresentou boa adaptação e tem alcançado alta produtividade devido as condições climáticas desta região, a qual permite o cultivo de frutas das espécies de clima temperado (ANTUNES, 2002, ANTUNES e RASEIRA, 2004, NACHTIGALL et al., 2004). Além das cultivares inicialmente introduzidas (Brazos, Comanche e Cherokee), a Embrapa Clima Temperado desenvolveu um programa de melhoramento genético originando as cultivares Ébano, Negrita, Tupy, Guarani, Cainguangue e Xavante (SANTOS; RASEIRA; MADAIL, 1997).

Segundo relatos de Chim (2008), atualmente a cultivar Tupy (Fig.1) é a que apresenta maior área de cultivo de amora-preta no Brasil, a qual resultou do cruzamento das cultivares Uruguai e Comanche, que foi realizado pela Embrapa Clima Temperado em 1982. A colheita destas frutas ocorre entre meados de novembro a início de janeiro.



Figura 1 – Amora-preta cv. Tupy

Fonte: JAQUES, 2008.

As plantas desta espécie são de porte ereto, vigorosas e com espinhos, e seus frutos apresentam de 7 a 9 g de peso médio, sabor equilibrado (acidez/açúcar), consistência firme, película resistente e com alto teor de sólidos solúveis (tab. 1).

Tabela 1 - Composição físico-química da amora-preta cultivar Tupy

Amora-preta cv Tupy	pH	Sólidos solúveis (°Brix)	Acidez (% ácido cítrico)	Carboidratos (%)	Umidade (%)
	3,23	8,0 - 9,0	1,33	4,72	91,37

Fonte: MOTA, 2006.

A amora-preta apresenta alta taxa respiratória e com isso seu período para consumo *in natura* é muito reduzido; portanto, a utilização desta fruta na forma processada é uma alternativa para prorrogar o período de consumo após colheita.

2.2.1 Agentes sanitizantes à base de cloro

Frutas e hortaliças são potenciais veiculadores de microrganismos que podem estar associados a toxinfecções alimentares e, conseqüentemente, a doenças transmitidas por alimentos (DTA). Inúmeras são as causas para a presença de elevada carga microbiana nesse tipo de produto, entre as quais estão as técnicas de cultivo, a prática do uso de adubo orgânico, a utilização de águas contaminadas para irrigação, o transporte realizado em engradados abertos, armazenamento, distribuição para consumo, e as condições de higiene no manuseio e preparo das refeições, principalmente quando os alimentos são consumidos crus (PACHECO et al., 2002). Portanto, uma das etapas de preparo de frutas para seu consumo, armazenamento ou processamento, consiste no processo de sanitização.

Sanitizantes contendo compostos à base de cloro, incluindo hipoclorito de sódio e de cálcio, são amplamente utilizados em várias etapas do processamento de frutas e hortaliças. Estes compostos são comumente adicionados à água para lavagem de alimentos crus, na água de limpeza e sanitização de equipamentos e na água utilizada no resfriamento de enlatados (BANWART, 1989). Porém, alguns fatores como concentração de cloro ativo da solução, tempo de ação do sanitizante e pH do meio, são determinantes para a eficácia do efeito antimicrobiano destas soluções (BANWART, 1989, ANDRADE & MARTYN, 1996).

Cloro “livre”, “ativo” ou “disponível” são termos que descrevem a quantidade de cloro em qualquer forma disponível para reações oxidativas e de desinfecção. Os compostos à base de cloro são germicidas de amplo espectro de ação. Reagem com proteínas da membrana de células microbianas, alterando sua permeabilidade, interferindo, desta forma, no transporte de nutrientes e promovendo o extravasamento dos componentes celulares (VANETTI, 2000).

O cloro como agente oxidante e desinfetante apresenta pequena estabilidade em fase líquida, por isto, após um determinado tempo de contato com a fase líquida os níveis de cloro tendem a zero ou a valores aproximadamente constantes, dependendo das dosagens aplicadas e do seu potencial de demanda.

As reações que envolvem o cloro residual livre e os compostos orgânicos naturais (CONs) são extremamente complexas, pois os compostos orgânicos apresentam uma elevada diversidade de grupos funcionais aromáticos, carboxílicos, fenólicos, bem como uma diversidade de duplas e triplas ligações que são passíveis de serem atacadas pelo agente oxidante. As reações do cloro livre com os CONs permitem a formação dos subprodutos da desinfecção, uma vez que a grande maioria destas reações químicas envolvem quebras de determinadas moléculas orgânicas e a substituição ou introdução do halogênio em sua estrutura molecular. Ao reagir com determinados CONs, o cloro participa de reações de oxidação química e de substituição, portanto a sua concentrações na fase líquida tende a reduzir, caracterizando desta forma uma demanda de cloro, que deverá ser satisfeita a fim de que seja possível o estabelecimento de concentrações relativamente estáveis de cloro residual na fase líquida (FILHO & SAKAGUTI, 2008).

Os compostos clorados possuem um amplo espectro de atividade biocida contra bactérias, fungos e vírus. As atividades biocida e oxidante destes compostos aumentam com a formação do ácido hipocloroso (HClO) em sua forma não dissociada, quando em solução aquosa pura. O ácido hipocloroso é um ácido fraco, cuja formação é influenciada pelo pH do meio, sendo que em meio ácido a sua concentração é alta. O poder biocida do cloro, depende grandemente de sua não dissociação em solução aquosa, um aumento no pH diminui substancialmente a atividade biocida de cloro, e uma redução no pH aumenta essa atividade na mesma proporção (EMMANUEL et al., 2004) (Fig.2). Para que ocorra a ação sanificante é necessário que o pH esteja abaixo de 7,5, podendo ser corrigido com um ácido orgânico ou com ácido muriático.

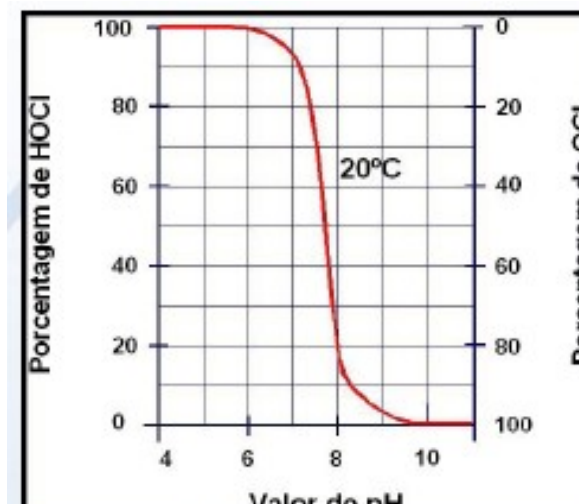


Figura 2: Presença de ácido hipocloroso em função do pH

Fonte: EMMANUEL, 2008.

O alto poder de desinfecção do ácido hipocloroso em relação às demais formas cloradas deve-se não somente à sua forte capacidade oxidativa, mas, principalmente, ao pequeno tamanho de sua molécula e à sua neutralidade elétrica, características que aumentam o seu poder de penetração nas membranas das células (EMMANUEL et al., 2004).

Quando um derivado clorado é adicionado a água ocorre, em primeiro lugar, a reação de oxidação da matéria orgânica, que recebe o nome de demanda de cloro. Satisfeita a demanda, o derivado clorado reage com a amônia formando cloraminas inorgânicas, que são denominadas de cloro residual combinado. Após a formação das cloraminas, tem-se a presença do cloro livre, o qual é constituido pelo ácido hipocloroso e do íon hipoclorito, conforme a Figura 2.

Apesar do cloro ser o agente sanitizante mais utilizado, existem ainda outros produtos que podem ser utilizados em alguns países, tais como: dióxido de cloro, ácido peracético, ozônio, hipofosfito de sódio, sulfito de sódio, iluminação ultravioleta e radiação UV-C. No entanto, nos últimos anos tem aumentado o questionamento quanto ao uso do hipoclorito e dos demais sais de cloro no processo e sanitização de frutas e hortaliças, por serem considerados precursores na formação de cloraminas orgânicas, as quais são prejudiciais à saúde devido ao seu alto potencial carcinogênico (SREBERNICH, 2007).

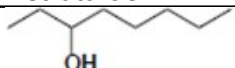
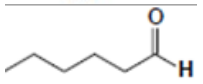
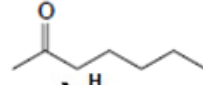
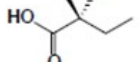
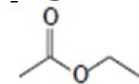
2.3 Compostos voláteis

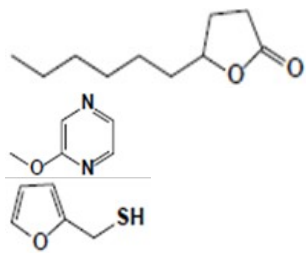
O conhecimento científico dos compostos químicos responsáveis pelo sabor característico das frutas tropicais e subtropicais justifica-se pela importância que estes desempenham na qualidade dos frutos e seus produtos (NARAIN et al., 2004).

Os compostos voláteis do aroma são, em sua maioria, substâncias termolábeis, sujeitos a rearranjos, ciclizações e oxidações, quando submetidos a qualquer aumento de temperatura. Se o estudo dos compostos voláteis responsáveis pelo aroma e sabor das frutas é útil na caracterização e classificação da origem das frutas, sua importância é ainda maior quando perdas ou modificações do aroma ocorrem devido ao processamento industrial, resultando em produtos que perdem o sabor original (THOMAZZINI & FRANCO, 2000).

O aroma típico das frutas resulta da combinação de dezenas ou centenas de substâncias voláteis representantes de diversas classes químicas, com diferentes propriedades físico-químicas e *thresholds* (limiar mínimo de percepção) (THOMAZZINI & FRANCO, 2000). A percepção do aroma depende do impacto individual de cada um desses compostos, mas o aroma real do alimento consiste do balanço global entre eles. Nenhum constituinte individual é totalmente responsável pelo aroma característico do produto, mas em alguns alimentos existem um ou mais componentes que, isoladamente lembram a qualidade característica de seu aroma, e por isso são denominados de compostos caráter-impacto (Tabela 2). Os demais compostos necessários para se obter o sabor pleno do alimento são denominados de compostos contribuintes (GUTH & GROSCH, 1999).

Tabela 2: Aromas característicos de algumas classes de compostos químicos

Classe	Composto	Estruturas	Aroma caracteístico
Alcoóis	3-octanol		Cogumelo
Aldeídos	Hexanal		Fruta não amadurecida
Cetonas	2-heptanona		Queijo <i>blue cheese</i>
Ácidos carboxílicos	Ácido 2-metilbutanóico		Fruta doce
Ésteres	Acetato de etila		Éter conhaque

Lactonas	γ -decalactona		Creme de nozes, pêssego Pipoca
Pirazina	2-acetilpirazina		
Compostos sulfurados	2-furfurilmetanotiol		Café

Fonte : FRANCO, 2003; NOGUEIRA, 2002).

Os compostos voláteis podem ser utilizados em diferentes contextos, e dentre suas diversas aplicações, pode-se destacar o uso na indústria alimentícia, como por exemplo na caracterização, reconstituição e formulação de aroma com maior fidelidade ao aroma natural de um alimento (FRANCO, 2003; NOGUEIRA, 2002).

O amadurecimento dos frutos é acompanhado pela redução do conteúdo de clorofila e aumento do conteúdo de outros pigmentos, como licopeno e β -caroteno. Os carotenoides são reconhecidos por determinar o padrão de coloração de frutos, e sua síntese esta intimamente relacionada com a produção de etileno durante o amadurecimento (JEFFERY et al., 1984, OELLER et al., 1991). Estes compostos são produzidos nos plastídios pela via do DOPX (1- desoxixilulose 5-fosfato), cujos precursores piruvato e gliceraldeido-3-fosfato estão envolvidos em outras rotas metabólicas do metabolismo primário. No entanto, carotenoides também podem atuar como precursores para a síntese de compostos voláteis (LEWINSOHN et al., 2005). Aumentos observados nos níveis de licopeno e β -caroteno em frutos vermelhos propiciam, portanto, condições para que alguns compostos voláteis sejam sintetizados.

2.3.1 Cromatografia gasosa na determinação de compostos voláteis

O desenvolvimento e aplicação de metodologias para determinação da composição química dos compostos voláteis é uma tarefa desafiadora. O método para o isolamento de compostos voláteis deve ser simples, rápido, eficiente e de baixo custo, compreendendo uma única etapa que separe os componentes voláteis da matriz do alimento ao mesmo tempo em que concentra-os com a menor manipulação possível.

Os voláteis podem ser separados utilizando-se técnicas cromatográficas, principalmente pela cromatografia gasosa. Nesta técnica, a separação baseia-se na diferença de distribuição das substâncias de uma amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa). A amostra, por meio de um sistema de injeção, é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas adequadas no local de injeção da amostra e na coluna de separação possibilita a vaporização dessas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferenciados (COLLINS et al., 2006).

A cromatografia gasosa é uma técnica que tem como vantagens a rapidez, um poder de resolução excelente, alta sensibilidade, podendo analisar até 10^{-12} g, além de operar com pequenas quantidades de amostra (CECCHI, 2003).

A separação dos componentes da amostra é efetuada na coluna cromatográfica, a qual deve ser devidamente escolhida, levando-se em consideração a dimensão, tipo e quantidade de suporte sólido que compõe a fase estacionária, pois com a seleção inadequada dessas condições será mais difícil obter resultados satisfatórios mesmo com equipamentos modernos e sofisticados (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000).

O injetor tem a função de vaporizar a amostra, que deve ocorrer de forma rápida e completa, sem decompor e fracionar a amostra. A quantidade de amostra injetada não deve ultrapassar a capacidade da coluna, que por sua vez, depende da quantidade da fase líquida estacionária (CECCHI, 2003). Os injetores mais usados atualmente para análises traços são os tipos *split/splitless* (no modo *splitless*), *on column* e *programmed temperature vaporizer* (PTV), envolvendo o efeito de focalização da amostra na entrada da coluna capilar (GROB, 1994). No entanto, a melhor opção para análise de compostos voláteis termolábeis é o injetor *cool on column*, no qual se evita a decomposição térmica ou a discriminação de compostos com pontos de ebulição elevados, pois permite a introdução direta da amostra na coluna cromatográfica sem vaporização prévia (THOMAZINI e FRANCO, 2000). Com esse tipo de injeção, a totalidade da amostra injetada é introduzida na coluna, evitando o emprego de conexões que poderiam introduzir artefatos ou diminuir a resolução da separação cromatográfica (BASTOS, 1996).

Os detectores estão situados na saída da coluna de separação, sua função é medir a quantidade dos componentes individuais separados, presentes na corrente

do gás de arraste, que elui da coluna cromatográfica. O sinal de saída do detector é enviado a um sistema de dados que finalmente traça um gráfico denominado cromatograma. O tipo de detector utilizado em uma análise depende de fatores tais como a natureza dos componentes separados e o nível da concentração a ser medido, sendo que para a análise de voláteis um dos mais utilizados é o detector de ionização de chama (DIC) (AQUINO NETO e NUNES, 2003).

A identificação dos compostos voláteis passou por um grande avanço, que foi iniciado com a associação de cromatógrafos gasosos a espectrômetros de massa (CG-EM). A união dessas duas poderosas técnicas de análise química introduziu uma ferramenta eficaz na separação e na identificação de compostos provenientes de misturas complexas. O seu emprego foi tão conveniente e útil em análise de aromas que a lista de compostos voláteis identificados cresceu acentuadamente a partir da década de 1970. A partir deste período, milhares de compostos voláteis já estão identificados em alimentos e bebidas, os quais estão agrupados em hidrocarbonetos, compostos oxigenados, nitrogenados e sulfurados. (BOELEN, 1995).

Os espectrômetros de massas fornecem boa estabilidade e sensibilidade para análises de compostos voláteis (THOMAZINI & FRANCO, 2000). As moléculas no estado gasoso são ionizadas em regiões de alto vácuo (10^{-8} atm) produzindo íons e fragmentos de íons que são encaminhados para um analisador de massa/carga e finalmente coletados pelo detector. A representação dos resultados constitui o espectro de massas, o qual demonstra a distribuição das espécies iônicas e suas abundâncias relativas. Cada composto, dependendo de sua estrutura química, passa por fragmentações particulares, gerando um espectro de massas característico, que pode ser utilizado como uma “impressão digital” daquele composto. As características dos espectros de massa são usadas na identificação de uma grande variedade de compostos orgânicos. Esses sistemas (CG-EM) possuem um banco de dados, armazenado na memória do computador que auxiliam na identificação do composto desconhecido através da comparação do mesmo com espectros obtidos de padrões puros (bibliotecas com substâncias puras e seus respectivos íons). Mesmo assim, é necessário o conhecimento das características de retenção quando compostos diferentes apresentam espectros de massas semelhantes. Por isto, como citado pela International Office of the Flavor Industry (IOFI), apenas os dados de cromatografia gasosa – espectrometria de massas,

muitas vezes podem ser insatisfatórios para uma identificação efetiva do composto. Assim, em alguns casos, informações adicionais obtidas por espectroscopia no infravermelho e por ressonância magnética nuclear ainda são necessárias (MCLAFFERTY e TUREČEK, 1993).

2.3.2 Métodos de isolamento dos compostos voláteis

Na análise dos compostos voláteis, a preparação da amostra é considerada a etapa inicial e crucial para obtenção de informações representativas do odor característico de uma matriz, pois qualquer modificação causada na composição dos voláteis da amostra nesta etapa não mais poderá ser corrigida, por mais sofisticados que sejam os instrumentos utilizados nas etapas subseqüentes. No entanto, representar qualitativamente o aroma original de uma determinada matriz é muito complicado, uma vez que os compostos voláteis apresentam diferentes propriedades químicas e estão presentes em quantidades extremamente diminutas, além de que alguns compostos são instáveis, podendo ser oxidados pelo ar, enquanto outros podem ser termolábeis, ou seja, qualquer aumento da temperatura durante o preparo da amostra poderá acarretar em reações químicas, tais como rearranjos, hidrólises, ciclizações, entre outras, as quais podem modificar a composição original da amostra (FRANCO, 2003; MAMEDE & PASTOR, 2006; MARSILI, 1997). A técnica aplicada para isolamento deve ser capaz de isolar os compostos voláteis enquanto limita a formação de artefatos (FRANCO, 2003).

As técnicas de isolamento de voláteis podem ser classificadas em tradicionais e modernas. Dentre as tradicionais a mais antiga e mais amplamente utilizada é a extração com solvente e dentre as técnicas modernas destaca-se a microextração em fase sólida (AUGUSTO et al., 2003).

2.3.2.1 Extração com solvente

A extração com solvente orgânico é um método importante e muito utilizado para o isolamento dos compostos voláteis, foi um dos primeiros métodos utilizados para recuperar compostos de aroma, principalmente em alimentos, sendo usada ainda pelas indústrias de perfumarias e de cosméticos (NOGUEIRA, 2002).

No entanto, os baixos níveis de compostos recuperados, aliado ao nível de componentes co-extraídos da matriz restringem o uso da extração direta. Outro problema da técnica consiste na formação de emulsões, principalmente se compostos não voláteis estiverem presentes na amostra. Esta técnica utiliza tanto solventes puros quanto misturas, sendo o diclorometano, éter etílico, éter de petróleo, pentano e o hexano os solventes mais utilizados, principalmente por apresentarem um baixo ponto de ebulição, permitindo assim que os componentes mais sensíveis não sejam destruídos por aquecimento, além da alta seletividade, permitindo que as substâncias odoríferas sejam removidas primeiro (NOGUEIRA,2002; MARSILI, 1997).

Apesar da sua simplicidade, a tendência moderna é substituir a extração líquido-líquido por outras técnicas, devido a alta pureza dos solventes que são requeridos para análise de traço, a necessidade de redução no ambiente de solventes orgânicos e ao risco a saúde associado a sua manipulação, além de não ser aplicada para análise de compostos voláteis em amostras vivas (AUGUSTO, 2003).

Dentre os trabalhos encontrados na literatura pode-se citar a extração líquido-líquido para determinar monoterpenos em vinhos, desenvolvido por Lopez e Gomez (2000), os quais avaliaram a capacidade de extração de sete solventes: diclorometano, éter-dietílico, freon 11, éter-pentano (1:1), éterhexano (1:1), pentano e hexano. Outros estudos foram realizados em diversas frutas, incluindo framboesa, morango, mirtilo e amora (HONKANEN, et al., 1980; HIRVI & HONKANEN, 1983; GEORGILOPOULOS, et al., 1987; RIU-AUMATELL 2004).

Esta técnica apresenta uma das abordagens mais simples e mais eficiente para o isolamento de aromas. A extração por solvente ou extração líquido-líquido (LLE) é baseado nos coeficientes de partição dos compostos responsáveis pelo aroma entre dois líquidos imiscíveis, geralmente de água e um solvente orgânico. A escolha do solvente é dependente do tempo de extração e as características dos voláteis alvo, tais como polaridade e solubilidade. Solventes não polares, tais como pentano, e hexano são muito eficazes na exclusão de água e alcoóis de baixa ebulição, enquanto o éter etílico irá extrair mais água e compostos polares (RIU-AUMATELL, 2004).

As técnicas de amostragem de voláteis mais recentes utilizam pouco ou nenhum solvente orgânico e, como qualquer método de amostragem, dependem da

partição entre os analitos da matriz e uma fase extratora que pode ser um gás, um líquido ou um adsorvente (NOGUEIRA, 2002).

2.3.2.2 Microextração em fase sólida no modo *headspace*

Dentre os métodos modernos de isolamento dos compostos voláteis, pode-se destacar a utilização do *headspace*

O princípio fundamental consiste no equilíbrio da fase gasosa com a fase líquida ou sólida da amostra. Os métodos que utilizam a amostragem no *headspace* visam minimizar a formação de artefatos e/ou a destruição da fração volátil, representando mais fielmente aroma de uma determinada matriz. Além da alta reprodutibilidade, a técnica mantém a integridade química das moléculas (FRANCO, 2003; AUGUSTO et al., 2003; MARSILI, 1997).

As técnicas de *headspace* (HS- *headspace* ou espaço confinado), se baseiam na análise dos compostos voláteis contidos na fase de vapor sobre uma solução em equilíbrio, mantida em ambiente fechado (COLLINS et al., 1988). Apresentam vantagens na extração de compostos voláteis de plantas por permitirem que o processo de extração ocorra a temperaturas baixas, reduzindo a probabilidade de alterações na composição da mistura volátil.

Estas técnicas podem ser empregadas no modo estático ou no modo dinâmico (DAMASCENO 2007). No modo estático a amostra é mantida em um recipiente fechado até que se atinja um equilíbrio termodinâmico dos compostos voláteis entre a fase líquida e a fase gasosa, a uma determinada temperatura, geralmente a ambiente. Após uma alíquota da fase gasosa é recolhida e injetada no cromatógrafo gasoso. No modo dinâmico há uma coleta contínua dos compostos voláteis, realizada pela passagem de um gás inerte ou por um sistema a vácuo, que empurra a amostra volátil para o cromatógrafo (FRANCO e RODRIGUEZ – AMAYA, 1983).

A utilização da técnica *headspace* em conjunto com a microextração em fase sólida (SPME) é um dos métodos mais modernos existentes para o isolamento dos compostos voláteis.

A microextração em fase sólida (SPME) (Figuras 3, 4, 5), é uma técnica de adsorção/dessorção de equilíbrio no modo estático desenvolvida na Universidade de Waterloo (Ontario, Canadá) que elimina a necessidade de utilização de solventes

orgânicos ou instrumentos sofisticados para a extração e concentração de compostos voláteis e não voláteis a partir de amostras líquidas ou gasosas, utilizando-se de um sistema de coleta e adsorção dos componentes voláteis (Fig.3). A extração fundamenta-se no equilíbrio de partição ou adsorção entre a fibra e os componentes da amostra ou de seu *headspace*. Quando o equilíbrio é alcançado, a quantidade de composto extraído está diretamente relacionada à afinidade com a fase da fibra e de sua concentração na amostra. Os compostos são dessorvidos termicamente, separados, identificados e quantificados posteriormente (ARTHUR et al., 1992; YANG & PAPPARD, 1994).

A técnica SPME origina resultados lineares dentro de um amplo intervalo de concentrações, é compatível com qualquer tipo de equipamento de cromatografia gasosa, com colunas de enchimento ou capilares, ou ainda com a cromatografia gasosa acoplada com a espectrometria de massa, podendo inclusive, ser utilizado com injetores split/splitless (GALLARDO, COSTA & BARROSO, 2009). Para extração de voláteis de vegetais, o modo headspace é o mais amplamente empregado (HS-SPME- *Headspace Solid-MicroExtraction*), o qual se baseia na exposição do filme polimérico à fase gasosa acima da amostra. Neste caso, os analitos a serem extraídos, apresentam suficiente volatilidade na temperatura de extração desejada (PAWLISZYN, 1997).

Em comparação com outras técnicas de preparo de amostra, a SPME apresenta uma série de características inerentes, por ser mais rápida e operacionalmente mais simples que muitas das técnicas tradicionais. O manuseio reduzido das amostras em comparação às técnicas convencionais minimiza a possibilidade de formação de artefatos. Os analitos podem ser extraídos e transferidos diretamente ao cromatógrafo gasoso, sem intervenção de solventes extratores, cujo uso, além de ser possível fonte de contaminantes, é um fator complicante no gerenciamento de um laboratório analítico, pela necessidade de adoção de procedimentos de descarte e pelos riscos ocupacionais associados à sua manipulação. Por estas características, a SPME é uma técnica que pode ser facilmente usada em aplicações em campo.

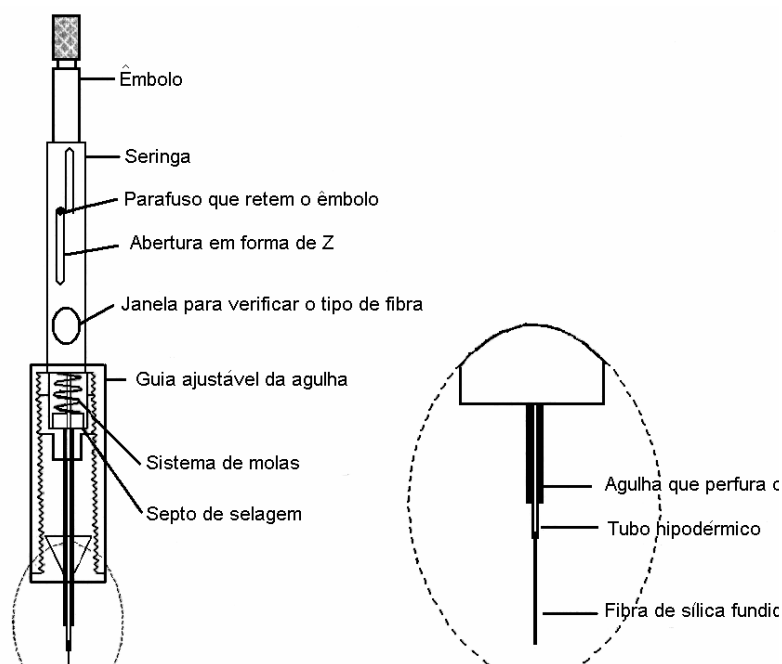


Figura 3: Dispositivo de SPME comercializado pela Supelco
Fonte: DAMASCENO, 2007

A técnica de SPME envolve apenas duas etapas de manipulação. A primeira etapa consiste em expor a fibra revestida diretamente à amostra ou ao seu *headspace* (HS). Nesta etapa ocorre a partição dos analitos alvo entre a matriz da amostra e o revestimento do dispositivo de SPME (Figura 4).

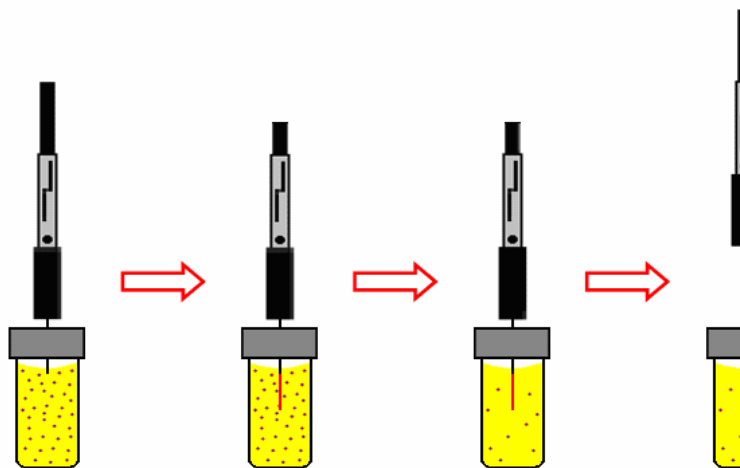


Figura 4: Representação do processo de sorção dos analitos: A) perfura-se o septo do frasco com a agulha; B) expõe-se a fibra revestida diretamente a amostra; C) a fibra permanece exposta até alcançar o tempo de equilíbrio e D) a fibra é recolhida para dentro da agulha e então retirada do frasco.

Fonte: BORTOLUZZI, 2007

Na segunda etapa, a fibra contendo os analitos concentrados é transferida para o instrumento analítico onde ocorre a dessorção, separação e quantificação dos analitos extraídos. A etapa de dessorção dos analitos geralmente é realizada colocando a agulha do dispositivo de SPME no injetor aquecido do cromatógrafo (Eisert, *et al.*, 1996 e Motlagh, *et al.*, 1993) (Figura 5).

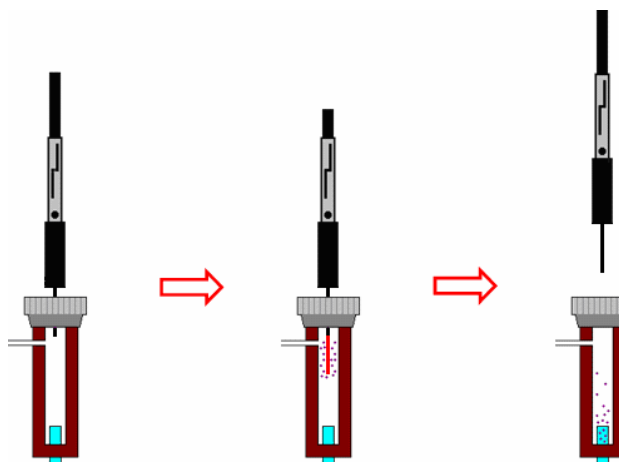


Figura 5 : Representação do processo de dessorção térmica dos analitos no injetor do cromatógrafo aquecido: A) perfura-se o septo do injetor do cromatógrafo com a agulha; B) expõe-se a fibra revestida ao injetor do cromatógrafo aquecido para que ocorra a dessorção térmica dos analitos e C) a fibra é recolhida para dentro da agulha e então retirada do injetor do cromatógrafo.

Fonte: BORTOLUZZI, 2007

Podem ser utilizados três formas de extração dos analitos usados em SPME: direta, *headspace* e protegida com membranas (Figura 6). Na amostragem direta (Fig. 6A), a fibra é colocada em contato direto com a amostra e os analitos são transportados diretamente da matriz da amostra para a fase extratora. Para facilitar esta forma de extração é necessário agitação da amostra. Para amostras gasosas, o fluxo natural do gás já é suficiente para facilitar o tempo de equilíbrio mais rápido, mas nas amostras líquidas é necessária alguma técnica de agitação. Na amostragem por *headspace* (Fig. 6B), a fibra é suspensa na região confinada sobre a matriz da amostra. A principal razão para esta modificação na amostragem é para proteger a fibra de efeitos desfavoráveis, causados por substâncias não voláteis ou com massa molecular muito grande, presentes na matriz da amostra. No terceiro tipo (Fig. 6C), extração protegida com membranas, a fibra é separada da amostra com uma membrana seletiva. O principal objetivo da utilização desta forma de extração é a extração de analitos presentes em amostras muito complexas. O processo de extração dos analitos nesta forma é mais lento do que na amostragem

direta porque os analitos precisam difundir na membrana (Pawliszyn, 1997, Pawliszyn, 1999).

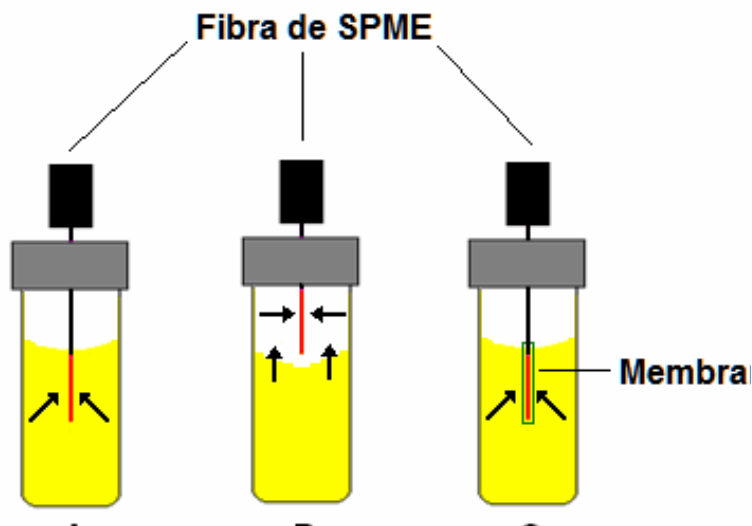


Figura 6: Formas de extração usando fibras de SPME: (A) direta, (B) *headspace*, (C) protegida com membranas.
Fonte: BORTOLUZZI, 2007

2.3.2.2.1 Característica dos revestimentos da SPME

No mercado existe uma variedade considerável de filmes poliméricos cada vez mais resistentes, tais como as fibras Stable-Flex, que são mais flexíveis e, portanto, apresentam menos probabilidade de quebra, além de maior tempo de vida, em função de maior estabilidade e menor sangria do filme (Sigma-Aldrich, 1999). Além das fibras Stable-Flex, foi lançada recentemente uma nova geração de fibras, cuja agulha é feita de um metal mais resistente e flexível, que também tem como função minimizar a incidência a quebra (Sigma-Aldrich, 2005).

Os revestimentos das fibras são classificados segundo sua polaridade (Figura 7): apolares (PDMS), polares (CW-DVB) e semi polares (PDMS-DVB, CAR-PDMS) (CEVA-ANTUNES, 2006; DEMYTTENAERE, et al., 2004). Existem também a DVB-CAR-PDMS, dotada de triplo revestimento, que é considerada como de polaridade intermediária (CEVA-ANTUNES, et al., 2006). Esta gama de polaridade disponível oferece vantagens como seletividade, possibilidade de maior recuperação de analitos específicos e redução da extração de interferentes (DEMYTTENAERE et al., 2004). As fibras mistas, por apresentarem subcamadas com diferentes polaridades, têm papel importante na

seletividade no que se refere à extração de analitos com pequenas diferenças de polaridade (ADAM, et al., 2005; DENG et al., 2004). À parte da polaridade, os revestimentos das fibras ainda podem ser classificados como polímeros puros homogêneos, tais como as fibras de PDMS e PA ou como polímeros sólidos dispersos em uma matriz polimérica líquida (fibras mistas), que são os de dupla ou tripla camada, tais como: CAR-DVB, PDMS-DVVB, CW-DVB e DVB-CAR-PDMS (Demyttenaere et al., 2004). Estes últimos apresentam menor estabilidade mecânica que as fases poliméricas homogêneas, mas ganham em seletividade, embora estas mesmas fases na nova versão (Stable-Flex) tenham aprimorado suas propriedades mecânicas (TARANTILIS & POLISSIOU, 1997).



Figura 7: Esquema representativo da classificação dos revestimentos poliméricos comerciais para SPME

Fonte: DAMASCENO, 2007

2.3.2.2.2 Condições que afetam a eficiência da SPME

Entre os fatores que influenciam a eficiência do processo extrativo estão a escolha do filme polimérico mais apropriado ao analito que se deseja extrair e o tipo de matriz em que está contido (NORIN & SMEDMAN, 2010). A escolha do filme, bem como de sua espessura, é geralmente feita em uma etapa de otimização das condições de análise (ADAM et al., 2005), tendo como base as características físico-

químicas dos analitos (Demyttenaere et al., 2004) e das fibras disponíveis (ADAM et al., 2005). Além destes, outros fatores como temperatura e o tempo do processo de extração, a adição de sal ou um solvente orgânico na amostra, modificações de pH, agitação, o volume da amostra, efeito da matriz e a introdução de uma etapa de derivatização, também podem afetar a extração dos analitos em SPME (PEÑALVER, et al., 1999).

O parâmetro pH da amostra pode ser ajustado para valores que aumentam a presença da forma neutra na extração de analitos ácidos ou básicos, como os fenóis e aminas. A adição de sal pode ser utilizada para aumentar a força iônica da amostra, levando a redução na solubilidade dos analitos que são mais facilmente retidos pela fibra. Muitos estudos demonstraram um aumento da sorção dos analitos no revestimento da fibra de SPME pela adição de sal, usualmente cloreto de sódio, na matriz da amostra. No entanto, a presença de solventes orgânicos na amostra aquosa usualmente reduz a quantidade de analito extraído, devido à competição entre os analitos e o solvente orgânico pela fibra de SPME (PEÑALVER, et al., 1999).

Quando a amostra é agitada, o tempo necessário para alcançar o equilíbrio é reduzido porque aumenta a difusão dos analitos ao redor da fibra, tanto para imersão direta quanto para exposição ao *headspace*. Diversas formas de agitação da amostra ao redor da fibra foram estudadas, sendo a agitação com barra magnética a mais amplamente utilizada (PEÑALVER, et al., 1999).

O volume da amostra é outro importante parâmetro para ser otimizado em SPME, porque ele é diretamente relacionado com a sensibilidade do método. O volume da amostra é usualmente muito maior que o volume da fibra, e a quantidade de analito extraído é somente proporcional ao coeficiente de partição, à concentração da amostra e ao volume da fibra. O coeficiente de partição entre a matriz da amostra e a fibra deve ser considerado, porque compostos com constante de distribuição elevada são mais afetados por mudanças no volume da amostra que com compostos com pequena afinidade pela fibra. Se o volume do *headspace* também é muito grande, a sensibilidade reduz consideravelmente (PEÑALVER, et al., 1999, GORECKI, et al., 1997, GORECKI, et al., 1998).

2.3.3 Aplicações da SPME em alimentos

Na literatura, pode ser encontrado algumas informações sobre o uso do *headspace* dinâmico para caracterização química de compostos voláteis, podendo-se citar os trabalhos desenvolvidos por Franco (1997), que isolaram os voláteis de três cultivares de manga (Haden, Tommy-Atkins e Keitt) oriundos do estado de São Paulo, envolvendo a sucção em polímero poroso Porapak Q.

Soares (2007), também utilizou o *headspace* dinâmico para avaliar o efeito do estágio de maturação na composição química dos voláteis da goiaba branca (*Psidium guajava*) utilizando o Porapak Q. Em um outro trabalho com frutos tropicais, Franco & Shikamoto (2007), estudaram os compostos voláteis de umbu-cajá (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) através da técnica do *headspace* dinâmico utilizando Porapak Q.

Outro exemplo do uso do Porapak Q no isolamento de voláteis de frutas por *headspace* dinâmico, foi realizado por Oliveira (2006), utilizando a pitanga conseguiu-se detectar 54 compostos, dos quais 29 foram identificados.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHEN, M.; YOUSEF, A. E. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. **Journal Food Science**, v.66, n. 9, p.1380-1384. 2001.

ALLENDE, A.; ARTÉS, F. UV-C radiation as a novel technique for keeping quality of fresh processed 'Lollo Rosso' lettuce. **Food Research International**, v.36, n.7, p.739-746, 2003.

ANDRADE, N. J.; MARTYN, M. E. L. **Limpeza sanitização na indústria de alimentos**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa,. 1996. 39p. no. 142.

ANSARI, S. H.; ALI, M.; NEHUERUELA, A. V.; ALONSO, J. P. Characterization of volatile constituents of mango "Qalmi" (*Mangifera indica* L.) fruit. **Journal of Essential Oil Research**, v.16, p.417-417, 2004.

ANTUNES, L. E. C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n.1, p.151-158, 2002.

ANTUNES, L.E.; RASEIRA, M.C.B. **Aspectos Técnicos da Cultura da Amora-preta** ISSN 1806-9193 Junho, 2004.

AQUINO NETO, F.R.; NUNES, D.; PADOVANI, R.M. Síntese das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. **Nutrição**, v.14, n.1, p.71-78, 2001.

AUGUSTO, F.; LOPES, A. L.; ZINI, C. A.; Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22 , p. 160-168, 2003.

BANWART, G. J. **Basic food microbiology**. 2.ed. New York:Van Nostrand Reinhold, 1989. 774p.

BASTOS, D.H.M. **Compostos voláteis de méis de eucalipto e laranja**. 1996. 148f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos Unicamp, Campinas.

BINTSIS, T.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; Robinson, R. K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry—a critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.80, n.6, p.637–645, maio, 2000.

BOELEN, M.H. Trends in aroma research and gas chromatography-olfactometry. **Perfumer Flavorist**, v.20, n.1, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Resolução RDC-12/01, de 2 de Janeiro de 2001. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45

CAMPOS, C. et al. Effects of storage in ozonized slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*sardine pilchardus*). **Journal Food Microbiol.**, v. 103, p.121-130. 2005.

CAMPOS, C. A. et al. Evaluation of ozone-slurry ice combined refrigeration system for the storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). **Food Chemistry**., v.97, n.2, p.223-230. 2006.

CECCHI, H.M. Cromatografia Gasosa. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2º edição. Campinas, São Paulo. Editora Unicamp, 2003

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 em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CHIATTONE, P.V.; TORRES, L.M.; ZAMBAZI, R.C. Aplicação do ozônio na indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.3, p.341-349.2008.

CIENTFUEGOS, F.; VITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro, Editora Interciência, 2000.

COLLINS, H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas, SP. Editora Unicamp, p.17-42, 2006.

DAUBENY, H.A. Brambles. **Fruit Breeding**. New York: John Wiley & Sons, 1996. p.109-190.

EMMANUEL, E.; KECK, G.; BLANCHARD, J.; VERMANDE, P.; PERRODIN, Y. Toxicological effects of disinfestations using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Environment International**, Oxford, v. 30, p. 891-900, 2004.

ESTRELA, C.; RIBEIRO, R. G.; ESTRELA, C. R. A.; PÉCORA, J. D.; SOUSANETO, M. D. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 58-62, 2003.

FILHO, S.S.F.; SAKAGUTI, M. Comportamento Cinético do Cloro Livre em Meio Aquoso e Formação de Subprodutos da Desinfecção. **Engenharia Sanitária Ambiental**. v.13,n. 2, p. 198-206, 2008.

FRANCO, M. R. B.; **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Varela, 2003.

FRANCO, M.R.B.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Trapping of soursop (*Annoma muricata*) juice volatiles on porapak Q by suction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.34, n.4, p.293-299, 1983.

FRANCO, M. R.; SHIKAMOTO, T. Volatile composition of some Brazilian fruits: umbu-caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*) and cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p.1263-1265, 2000.

FRANKEN, M. S. **The application of ozone technology for public health and industry**. Disponível em: <http://fss.k-state.edu>. Acesso em: 11 nov. 2010.

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.

GARDNER, D.W.; SHAMA, G. Modeling UV-induced inactivation of microorganisms on surfaces. **Journal of Food Protection**, v.63, n.1, p.63-70, 2000.

GEORGILOPOULOS, D. N.; GALLOIS, A. N. Aroma compounds of fresh blackberries (*Rubus laciniata* L.). **Z. Lebensm. Unters. Forsch.** v. 5, n.184, p. 374-380, 1987.

GROB, K. Injection Techniques in capillary GC. **Analytical Chemistry**, v.66, 1994

GUTH, H.; GROSCH, W. In: Teranishi R, Wick El, Homstein I, Editor. **Flavor Chemistry**. New York: Kluwer Academic/Plenum, p.387-395, 1999.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in food industry. **Lebensm-Wiss.u.-Technol**, v. 37, p. 453-460. 2004.

HIRVI, T.; & HONKANEN, E. The aroma of some hybrids between high-bush blueberry (*Vaccinium corymbosum*, L.) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*, L.). **Z. Lebensm. Unters. Forsch.** v.5, n. 176: p. 346-349, 1983.

HONKANEN, E.; PYYSALO, T.; & HIRVI, T.. The aroma of Finnish wild raspberries, *Rubus idaeus*, L. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, v.3, n. 171, p. 180-182, 1980.

JACQUES, A. **Amora-preta**. Pelotas, 2008. 1 fot. (6,06 X 9,08cm), color.

JEFFERY, D.; SMITH, C.; GOODENOUGH, P.; PROSSER, I.; GRIERSON, D. Ethyleneindependent and ethylene-dependent biochemical changes in ripening tomatoes. **Plant Physiology**, v.74, p.32-38, 1984.

KEYSER, M.; MULLER, I.A.; CILLIERS, F.P.; NEL, W.; GOUWS, P.A. Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v.9, n.3, p.348-354, jul, 2008.

KUBOTA, T. **Contribuição à química dos compostos voláteis de frutos do nordeste: *hancornia speciosa***. 2007. 143f. Dissertação, Pós Graduação em Química. Universidade Federal de Sergipe, Sergipe

LEWINSOHN, E.; SITRIT, Y.; BAR, E.; AZULAY, Y.; IBDAH, M.; MEIR, A.; YOSEF, E.; ZAMIR, D.; TADMOR, Y. Not just colors - carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p.407- 415, 2005.

LOPEZ, E.F.; GOMEZ, E.F. Comparasion of solvents for determination of monoterpenos in wine using liquid-liquid extraction. **Chromatographia**, v.52, p. 798-802, 2000.

MAMEDE, M. E. O.; PASTOR, G.M. Study of methods for extraction ol volatile compounds from fermented grape must. **Food Chemistry**, v. 96, p. 586-590, 2006.

MARSILI, R.; **Techniques for analyzing food aroma**. New York, Marcel Dekker Inc., 1997.

MSAADA, K.; HOSNI, K.; TAARIT, M. B.; CHAHED, T.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B.; Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1131-1134, 2007

MCLAFFERTY, F.W. TURECEK, F. Interpretation of massa spectra. 4ed Sausalito: Univ Science Bookks, 371p, 1993.

MOTA, R.V. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DE GELEIA DE AMORA-PRETA. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v.26, n.3, p.539-543, 2006.

NACHTIGALL, A.M.; SOUZA, E.L.de; MALGARIM, M.B.; ZAMBIAZI, R.C. Geléias light de amora-preta. **Boletim Ceppa**, v.22, n.2, p.337-354, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and Analysis of Phenolics in Food (Review). **J. of Chromatography A**, n. 1054, p.95-111, 2004. In: berry extracts: an evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology. *Food chem.*, v.113, p.331-335, 2009.

NARAIN, N.; ALMEIDA, J.N.; GALVÃO, M.S.; BRITO, E.S. Compostos voláteis os frutos maracujá e cajá obtidos pela técnica de headspace dinâmico. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v.24, n.22, p.212-216, 2004.

NICKERSON, G.B.; LIKENS, S.T. Gas chromatographic evidence for occurrence of hop oil components in beer. **Journal of chromatographic science**, v.21, 1p, 1996.

NOGUEIRA, P. C. L.; **Contribuição à química dos compostos voláteis e interações com os organismos receptores**. Tese de doutorado – Unicamp – Campinas 2002, 211p.

OELLER, P.W.; WONG, L.M.; TAYLOR, L.P.; PIKE, D.A.; THEOLOGIS, A. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. **Journal Science**, v.254, p.437-439, 1991.

OLIVEIRA, M.E.B.; BASTOS, M.S.R.; FEITOSA, M.; BRANCO, A.A.C.; SILVA, M.G.G. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de acerola, cajá e caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.9, n.3, 1999.

OLIVEIRA, A. L.; LOPES, R. B.; CABRAL, F. A.; EBERLIN, M. N.; Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, v.99, p. 1-5, 2006.

PACHECO, M. A. S. R.; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, H. G. G.; CÂNDIDO, V. L. P.; GOMES, A. H. S.; ARMELIN, I. M.; BERNARDES, R. Condições higiênico-sanitárias de verduras e legumes comercializados no CEAGESP de Sorocaba-SP. **Higiene Alimentar**, v.16, n. 101, p.50-55, 2002.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Pequenas frutas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Vacaria, RS. **Anais do Seminário Brasileiro Sobre Pequenas Frutas**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2003, p.7-15.

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

PENNARUM, A. L.; PROST, C.; DAMAIMAY, M. Aroma extracts from oyster *crassostrea gigas*: comparison of two extraction methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 299-304, 2002.

POLTRONIERI, E. Alternativas para o mercado interno de pequenas frutas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Vacaria, RS. Anais do Seminário Brasileiro sobre Pequenas Frutas. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2003, p.37-40.

QIAN, M.; KLESK, K. Aroma Extract Dilution Analysis of Cv. Marion (*Rubus spp. hyb*) and Cv. Evergreen (*R. laciniatus* L.) Blackberries. **Journal Agric. Food Chem.** 2003, 51, 3436-3441

RIU-AUMATELL M. A; CASTELLARI, M.; LOPEZ-TAMAMES, E.; GALASSI, S.; BUXADERAS, S. Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS **Food Chemistry**, v. 87, p. 627-637, 2004.

SANTOS, A. M.; RASEIRA, M.C.B.; MADAIL, J.C.M. **A cultura da amora-preta**. Coleção Plantar, 33. Brasília: Embrapa SPI. 1997. 61p.

SIDES, A.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S. Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19 , p. 322-329, 2000.

SOARES, F. D.; PEREIRA, T.; MARQUES, M. O. M.; MONTEIRO, A. R. Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. **Food Chemistry**, v.100, p.15-21, 2007.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M.R.B. Metodologia para analise de constituintes voláteis do sabor. **Boletim SBCTA**, v.34, n.1, p.54-59, jan/jun, 2000.

TIEMAN, D.M.; ZEIGLER, M.; SCHMELZ, E.A.; TAYLOR, M.G.; BLISS, P.; KIRST, M.; KLEE, H.J. Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.887-896, 2006.

VANETTI, M.C.D. Controle microbiológico e Higiene no processamento mínimo. In: II Encontro Nacional sobre processamento mínimo de frutas e hortaliças. Palestras Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2000. p. 45.

VATTEN, D.A. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. **Process Biochemistry**, v.40, p.1583-1592, 2005.

4. CAPÍTULO I. Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp)

Phytochemicals in blackberry

Andressa Carolina Jacques^{1*}; Rui Carlos Zambiasi²

Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, n. 1, p. 245-260, jan./mar. 2011

Resumo

Dentre as opções de espécies frutíferas com perspectivas de comercialização, a amoreira-preta (*Rubus* spp) se destaca como uma das mais promissoras. Esta é uma das espécies que tem apresentado um crescimento de área cultivada nos últimos anos no Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro). O consumo regular de frutas e hortaliças está associado com o baixo risco de incidência e mortalidade por câncer e doenças cardíacas, devido à presença de compostos oriundos do metabolismo secundário, especialmente flavonóides e antocianinas, os quais apresentam grande capacidade de reagir com radicais livres que causam estresse oxidativo, e portanto, contribuem na prevenção destas doenças. Na identificação dos compostos fenólicos na amora-preta foram encontrados os ácidos fenólicos e flavonóides. Dentre os flavonóides encontrados, destacam-se as antocianinas, que variam em sua concentração de acordo com o estágio de maturação das frutas. Tendo como base os valores encontrados na literatura sobre antocianinas e a grande variação entre os diferentes materiais genéticos, existe um grande potencial na produção de amora-preta visando a sua utilização como corante natural na indústria alimentícia e de medicamentos. Além dos compostos fenólicos, a amora-preta também apresenta outros fitoquímicos como as vitaminas C e E, além de carotenóides. Este trabalho tem como objetivo fazer uma revisão bibliográfica dos principais fitoquímicos presentes na amora-preta (*Rubus* spp).

Palavras-chave: Amora-preta, fitoquímicos, antioxidantes

Abstract

Among the options for fruit species with market prospects, the blackberry (*Rubus* spp) stands out as one of the most promising. This is a species that has shown an increase of cultivated area in recent years in Rio Grande do Sul (main Brazilian producer). Regular consumption of fruits and vegetables is associated with low risk of incidence and mortality from cancer and heart disease due to the presence of compounds derived from secondary metabolism, especially flavonoids and anthocyanins, which have great capacity to react with free radicals that cause oxidative stress, and therefore contribute to the prevention of these diseases. The phenolic acids and flavonoids were identified in the group of phenolic compounds in blackberry. Among the flavonoids, stands out the anthocyanins, which vary in concentration according to the stage of maturation of fruits. Based on the anthocyanin content related in literature and the great variation between different genetic materials, there is great potential in the production of blackberry and its utilization as a natural colorant in the food and pharmaceuticals industry. In addition to these compounds, the blackberry also has other phytochemicals such as vitamin C, vitamin E and carotenoids. This paper aims to review literature of the main phytochemicals in blackberry (*Rubus* spp).

Key words: Blackberry, phytochemicals, antioxidants

1 Doutoranda do Departamento Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, UFPEL. E-mail: andressa.jacques@yahoo.com.br

2 Prof. Titular do Departamento de Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, UFPEL. E-mail: zambiasi@gmail.com

* Autor para correspondência

1 Introdução

A mudança no hábito alimentar da população brasileira, observada nos últimos anos, tem proporcionado um novo nicho de mercado de frutas frescas. A produção brasileira das principais espécies frutíferas de clima temperado é insuficiente para atender a demanda interna, gerando uma crescente necessidade de importação de frutas que, na sua grande maioria, poderiam ser produzidas no Brasil (ANTUNES, 2002).

Dentre as opções de espécies frutíferas com perspectivas de aumento de produção e aumento de oferta para a comercialização, a amoreira-preta (*Rubus* spp) se destaca como uma das mais promissoras. Esta é uma das espécies que tem apresentado um crescimento de área cultivada nos últimos anos no Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro), mas apresenta alto potencial de cultivo em regiões de clima temperado e sub-tropical, como nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Sul de Minas Gerais. Devido ao baixo custo de implantação e de manutenção do pomar e, principalmente, pela reduzida utilização de defensivos agrícolas, esta cultura se apresenta como opção para a agricultura familiar. O cultivo da amoreira-preta caracteriza-se pelo retorno rápido, pois no segundo ano de plantio inicia a produção, proporcionando ao pequeno produtor opções de renda, pela destinação do produto ao mercado *in natura*, e também como matéria-prima para indústrias processadoras de alimentos, como indústrias de produtos lácteos, de congelados e conserveiras (ANTUNES, 2002).

A amora-preta *in natura* é altamente nutritiva, contendo 85% de água, 10% de carboidratos, elevado conteúdo de minerais, de vitaminas do complexo B, vitamina A e cálcio. Estes frutos podem ser consumidos na forma de sub-produtos como geléias, sucos, e como ingrediente em sorvetes e iogurtes (POLING, 1996).

Uma série de funções e constituintes químicos são relatados na literatura internacional relacionados às qualidades da amora-preta, estando, entre eles, o ácido elágico (ANTUNES, 2002). O ácido elágico é um derivado do ácido gálico, e como fenol, possui algumas propriedades de compostos fenólicos (WANG et al., 1994). Segundo Wang et al. (1994), o ácido elágico (C₁₄H₆O₈) é encontrado em morango (*Fragaria* spp), groselha preta (*Ribes nigrum*), amoreira-preta (*Rubus* subgênero *Eubatus*), framboesa (*Rubus* subgênero *Idaeobatus*), entre outras espécies. O ácido elágico e alguns elagitânicos têm mostrado propriedades

inibidoras contra replicação do vírus HIV transmissor da Aids (MAAS, GALLETA, e STONER 1991).

Além dos nutrientes essenciais e dos micronutrientes, as frutas contribuem com diversos componentes oriundos de metabólicos secundários, principalmente os de natureza fenólica, denominados de polifenóis. O consumo regular de frutas e hortaliças está associado com o baixo risco de incidência e mortalidade por câncer e doenças cardíacas, devido à presença de compostos oriundos do metabolismo secundário, especialmente flavonóides e antocianinas, os quais apresentam grande capacidade de reagir com radicais livres, e portanto, contribuem na prevenção de várias doenças. Estes compostos apresentam ainda, atividade anti-inflamatória, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana e antineoplásica (KUSKOSKI et al., 2005).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: os que apresentam atividade enzimática e os que não apresentam atividade enzimática. Na primeira, estão incluídos os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão incluídas moléculas que interagem com as espécies radicalares, as quais são consumidas durante a reação; incluindo os antioxidantes naturais e sintéticos, como os compostos fenólicos (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

Os compostos fenólicos presentes nas plantas são essenciais para o crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agentes antipatogênicos e contribuírem na pigmentação, adstringência e estabilidade oxidativa. Dentre os compostos fenólicos do grupo dos flavonóides se encontram as antocianinas. As antocianinas são pigmentos que conferem uma coloração que varia entre o laranja, vermelho e azul. Segundo Shahidi e Marian (2003), estudos recentes demonstram que as antocianinas atuam como antioxidantes naturais, promovendo vários benefícios à saúde.

Além das antocianinas, os carotenóides também possuem capacidade antioxidante, apesar de estarem presentes em baixas quantidades na amora-preta. De acordo com Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya (2004), a cor e a atividade biológica dos carotenóides estão intrinsecamente relacionados com sua estrutura molecular. O consumo de frutas e hortaliças com alto teor de carotenóides tem apresentado, também, uma relação inversa com o risco de desenvolvimento de câncer (KRINSKY, 1989, 1991).

Além dos compostos fenólicos e carotenóides, a amora-preta ainda apresenta tocoferóis, os quais ocorrem naturalmente em praticamente todos os vegetais, principalmente nos vegetais verde-escuros, nas sementes oleaginosas, nos óleos vegetais e no gérmen de trigo; e a vitamina C ou ácido L-ascórbico (AA), que é uma vitamina hidrossolúvel e termolábil amplamente distribuída nos vegetais e em produtos de origem vegetal, sendo encontrada, principalmente, em frutas cítricas e hortaliças folhosas (ZHANG; HAMAUZU, 2004).

Em face do exposto, esta revisão tem como objetivo apresentar os principais fitoquímicos presentes na amora-preta (*Rubus* spp) e os efeitos na saúde.

2 Amora-Preta

A amoreira-preta (*blackberry*) pertence ao gênero *Rubus* que contém aproximadamente 740 espécies que são subdivididas segundo alguns autores em 12 subgêneros, e segundo outros autores em 15 subgêneros (DAUBENY, 1996). Esta frutífera possui porte ereto ou rasteiro, a qual produz frutos agregados, formado por mini-drupas com cerca de quatro a sete gramas, de coloração negra e sabor ácido a doce-ácido.

O cultivo da amoreira-preta começou na segunda metade do século XIX nos Estados Unidos, onde é conhecida como *blackberry*. No Brasil, as primeiras cultivares foram introduzidas em 1972, no Centro de Pesquisa da Embrapa Clima Temperado, localizada em Pelotas-RS. Esta cultura apresentou boa adaptação e tem alcançado alta produtividade devido às condições climáticas desta região, a qual permite o cultivo de frutas das espécies de clima temperado (ANTUNES, 2002; ANTUNES; RASEIRA, 2004; NACHTIGALL et al., 2004). Além das cultivares inicialmente introduzidas, Brazos, Comanche e Cherokee, a Embrapa Clima Temperado desenvolveu um programa de melhoramento genético, originando as cultivares Ébano, Negrita, Tupy, Guarani, Cainguangue e Xavante (SANTOS; RASEIRA; MADAIL, 1997).

Segundo relatos de Chim (2008), atualmente a cultivar Tupy é mais cultivada no Brasil, a qual resultou do cruzamento das cultivares Uruguai e Comanche, realizado pela Embrapa Clima temperado em 1982. A colheita destas frutas ocorre entre meados de novembro a início de janeiro.

A amora-preta apresenta valores de pH de 2,33, para a cultivar Wild da região do Patzcuaro/México (REYES-CARMONA et al., 2005), a valores de 3,40 para amora-preta de cultivares da região de Pelotas/RS/Brasil (JACQUES, 2009). Estudos realizados em Thessaloniki na Grécia, relatam variações no conteúdo de sólidos solúveis de cultivares não mencionadas de amora-preta (*Rubus fruticosus*) de 9,8 à 11,5% (PANTELIDIS et al., 2007). Mota (2006a), relata variações no conteúdo de sólidos solúveis de 7,60 à 10,37% em amora-preta de diversas cultivares oriundas da Estação Experimental de Caldas em Poços de Caldas/Minas Gerais/Brasil. Jacques (2009) relata valores de acidez de 0,11% (em ácido cítrico) para amora-preta da cultivar Tupy oriunda da cidade de Pelotas/RS/Brasil, no entanto, Mota (2006a) relata valores de acidez de 1,33% (em ácido cítrico) para amora-preta da mesma cultivar oriunda da cidade de Poços de Caldas/MG/Brasil, demonstrando a grande variabilidade no conteúdo de acidez que ocorre em frutos cultivados em locais com climas distintos.

De acordo com estudos realizados na Embrapa Clima Temperado (2008), ocorre uma grande variação de temperatura entre o dia e a noite em algumas regiões no Sul do Brasil, geralmente maior que 10°C, principalmente nos períodos de primavera e outono. A amplitude térmica, associada às baixas temperaturas, é importante para conferir coloração e para o equilíbrio de acidez e açúcar, que é um fator determinante para o sabor do fruto consumido *in natura*.

Mota (2006a) relata valores de umidade na amora-preta cultivares Tupy e Guarani, de 91,7 e 90,47%, respectivamente. Chim (2008) relata para as mesmas cultivares, respectivamente, 88,3% e 87,0%. Pode-se observar que pelos estudos de Chim (2008), o teor de umidade de duas das cultivares foi inferior, demonstrando a variabilidade da constituição química de frutas de diferentes regiões.

A amora-preta *in natura* é altamente nutritiva, fazendo parte de sua composição a água (87-93%), proteínas (1,5%), fibras (3,5 – 4,7%), cinzas (0,19 – 0,47%), lipídeos (0,03 – 0,08%), carboidratos (6 – 13%). Apresenta ainda conteúdos consideráveis (em mg/100g) de cálcio (32); fósforo (21); potássio (196); magnésio (20); ferro (0,57); selênio (0,60) e vitamina C (21); além de quantidades inferiores de vitamina A, vitamina E, folatos, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, vitaminas B-6 e B-12; ácidos graxos saturados; ácidos graxos monoinsaturados; e de ácidos graxos polinsaturados. No entanto, este fruto apresenta apenas cerca de 50-55 calorias em 100 gramas (Embrapa Clima Temperado, 2008). O consumo

regular desta fruta, aliado a um estilo de vida saudável, incluindo dieta equilibrada e exercícios físicos, pode prevenir alguns tipos de doenças crônicas não-transmissíveis. Além disto, alguns compostos encontrados nesta fruta, como as antocianinas, podem ser utilizados na indústria alimentícia como corante natural, seguindo a tendência mundial de redução no uso de corantes artificiais. A purificação e concentração de alguns fitoquímicos da amora-preta, como o ácido elágico, podem ser apresentados na forma de encapsulados, e comercializados como nutracêuticos (Embrapa Clima Temperado 2008).

O processamento das frutas da amoreira-preta, em produtos como geléias, sucos, iogurtes e sorvetes, é uma forma de agregar valor ao produto *in natura*, auxiliando na renda dos fruticultores. No entanto, após o processamento podem ocorrer alterações das características funcionais originais das frutas, mas o impacto do processamento sobre as propriedades funcionais da amora-preta ainda está sendo estudado. Existem alguns estudos que relatam estas alterações, como os de Jacques (2009); Chim (2008) e Mota (2006b); os quais avaliaram a estabilidade de alguns dos principais fitoquímicos da amora-preta em produtos como polpa, geléia e suco respectivamente. No entanto, sabe-se que frutas e hortaliças respondem de forma diferenciada ao processo de transformação.

3 Fitoquímicos

A promoção da saúde como qualidade de vida e a busca por uma alimentação saudável têm sido metas a serem alcançadas neste século. Trabalhos envolvendo a atividade antioxidante de alimentos e substâncias isoladas de fontes naturais demonstram que o consumo de frutas, vegetais, vinhos e chás, estão relacionados à redução de risco de câncer e de doenças cardiovasculares (AJILA et al., 2007). De acordo com Speirs e Brady (1991), o amadurecimento de frutas envolve uma série de complexas reações bioquímicas, como a hidrólise do amido, a produção de carotenóides, de antocianinas e de compostos fenólicos, além da formação de vários compostos voláteis.

Publicações recentes relatam as propriedades de vários fitoquímicos com ação antioxidante, destacando-se os compostos fenólicos, os tocoferóis, o ácido ascórbico e os carotenóides, todos estes presentes na amora-preta. Esta fruta apresenta atividade antioxidante frente aos radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxila ($OH^{\bullet}$) e ao oxigênio singlete (O_2) (Wang e Jiao, 2000).

Os valores que expressam a atividade antioxidante variam de acordo com o método utilizado. Em estudos *in vitro*, extratos de amora-preta apresentaram efeito antioxidante como “scavenger” do radical peroxinitrito, protegendo estas células de disfunções e falhas vasculares induzidas por este radical (SERRAINO et al., 2003).

Extratos de amora-preta têm apresentado efeito anti-mutagênico (TATE et al., 2006) e anti-carcinogênico em linhagens humanas de câncer de útero, câncer de cólon (LAZZE et al., 2004), câncer oral, câncer de mama, câncer de próstata (SEERAM et al., 2006) e câncer de pulmão (DING et al., 2006). Segundo Tate et al. (2004), extratos de amora-preta podem prevenir a formação de metastase. Em muitos casos o efeito anti-carcinogênico da amora-preta ocorre devido ao efeito anti-inflamatório de seus extratos. Demonstrou-se que a capacidade antioxidante do plasma aumenta em 30% após a ingestão de suco contendo amora-preta (NETZEL et al., 2002).

O efeito antioxidante demonstrado *in vivo* é de grande importância para incentivar o consumo destas frutas. Em ratos, antocianinas extraídas de amora-preta foram capazes de reduzir o número e o tamanho de tumores (câncer de pele) malignos e não malignos, os quais foram induzidos quimicamente na pele destes animais. Estes compostos inibiram a migração e invasão do câncer (DING et al., 2006).

Dentre os fitoquímicos presentes em frutos de amora-preta, 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 (OH^-), que possuem capacidade doar Hidrogênio aos radicais livres presentes no organismo, impedindo sua ação, que pode causar danos e/ou oxidação de componentes celulares (SEVERO et al., 2009).

3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004). Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autooxidação (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992). Os compostos fenólicos presentes nas fontes vegetais são classificados como flavonóides e não flavonóides.

Os flavonóides são os compostos que apresentam a estrutura química básica como C6-C3-C6 (Figura 1). A presença e distribuição dos flavonóides nos vegetais depende de diversos fatores, como ordem e família do vegetal, bem como da variação das espécies. Os flavonóides são formados a partir da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004).

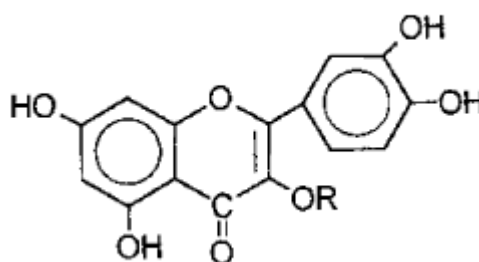


Figura 1. Estrutura básica dos flavonóides.

Fonte: Skerget et al. (2005).

Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente dos raios ultravioleta, pois a formação dos flavonóides é acelerada pela luz. O frio é um fator importante durante o período de dormência, para proporcionar índices adequados de brotação. No entanto, se as plantas forem submetidas ao frio fora dessa fase, pode causar sérios danos às gemas, flores e frutos em desenvolvimento, principalmente devido as geadas tardias de primavera (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004).

As antocianinas fazem parte do grupo dos flavonóides, que apresentam como características o núcleo básico flavílio (cátion 2-fenilbenzopirílio), o qual consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos, que são condensados por um oxigênio. A molécula de antocianina (Figura 2) é constituída por duas ou três porções, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, freqüentemente, um grupo de ácido orgânico (FRANCIS, 1989). As antocianinas possuem uma estrutura química adequada para a ação antioxidante, sendo capaz de doar elétrons ou átomos de hidrogênio para radicais livres (PRIOR, 2003).

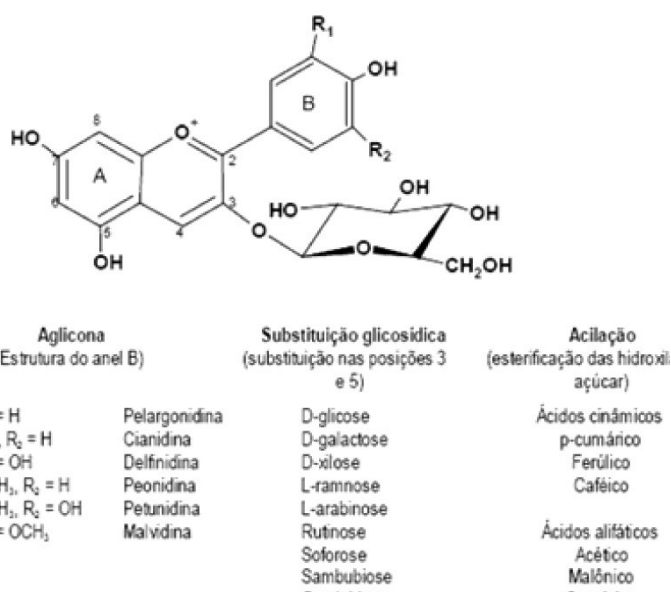


Figura 2. Estrutura geral da molécula de antocianina

Aproximadamente 22 agliconas são conhecidas, das quais 18 ocorrem naturalmente e apenas seis (pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina e malvidina) são importantes em alimentos (FRANCIS, 2000). Antocianidinas livres são raramente encontradas em plantas, ocorrendo comumente glicosiladas com açúcares que estabilizam a molécula (FRANCIS, 2000). A glicosilação pode ocorrer em várias posições, sendo observada com maior frequência na posição 3 do anel aromático.

A quantidade de antocianinas na amora-preta varia em de acordo com o estágio de maturação das frutas. Estudos demonstram que seu conteúdo aumenta de 74,7 mg equivalente de cianidina-3-glicosídeo. $100g^{-1}$ peso fresco em frutos ainda verdes para 317 mg cianidina-3-glicosídeo. $100g^{-1}$ peso fresco em frutos sobremaduros (SIRIWOHARN; WROLSTAD, 2004). De acordo com Sellappan, Akoh e Krewer (2002), a variação no conteúdo de antocianinas entre cultivares pode ser bem acentuada, podendo variar de 12,70 a 197,34 mg. $100g^{-1}$ fruta. Estudos realizados por Wang e Lin (2000) com frutos de amora-preta, framboesa e morango, indicaram que os frutos maduros de framboesa preta e de amora-preta, constituem fontes ricas em antocianinas (197,2 mg. $100g^{-1}$ fruta e 152,8 mg. $100g^{-1}$ fruta, respectivamente) quando comparados com frutos maduros de framboesa vermelha (68,0 mg. $100g^{-1}$ fruta) e de morango (31,9 mg. $100g^{-1}$ fruta). Salienta-se que estas frutas, assim como a amora-preta, pertencem à família botânica das Rosáceas.

Estudos realizados por Jacques (2009), relatam teores de antocianinas totais na amora-preta cultivar Tupy na faixa de 140,73 mg cianidina-3-glicosídeo.100g⁻¹fruta, valores muito similares aos relatados por Chim (2008), de 137,59 mg cianidina-3-glicosídeo.100g⁻¹ fruta. Ambas as frutas foram oriundas da região de Pelotas/RS/Brasil, porém de safras diferentes. Os valores de antocianinas totais relatados para amora-preta cultivar Tupy cultivada na cidade Poços de Caldas/MG/Brasil, foram pouco inferiores, 116,76 mg cianidina-3-glicosídeo.100g⁻¹fruta, demonstrando a variabilidade em função do local de plantio.

Dentre as antocianinas identificadas em amora-preta, incluem-se a cianidina-3-glicosídeo (SERRAINO et al., 2003), cianidina-3-arabinosídeo, cianidina-3-galactosídeo, malvidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, cianidina-3-xilosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, cianidina-malonoil –glicosídeo (FAN-CHIANG; WROLSTAD, 2005), cianidina-dioxaloil-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo (SEERAM et al., 2006) e malvidina-acetilglicosídeo (REYES-CARMONA et al., 2005). Em termos quantitativos, 80% do total das antocianinas são na forma de cianidina-3-glicosídeo (SERRAINO et al., 2003).

Estudos tem demonstrado que o processamento, de forma geral, induz a redução no teor inicial de antocianinas. Em amora-preta é utilizada para a elaboração de geléia, foi observado uma perda de antocianinas em média de 8,8 % em relação aos valores encontrados na polpa. O armazenamento à temperatura ambiente das geléias em recipientes de vidros transparentes resultou em perdas de 32 % do conteúdo de antocianinas nos primeiros 40 dias de estocagem e outros 11% nos 50 dias subseqüentes (MOTA, 2006b). Estudos realizados em suco de amora-preta, reforçam a idéia de que as antocianinas sofrem redução pós processamento. Mota (2006a) demonstrou que ocorreu uma redução de 42% do teor inicial de antocianinas através da elaboração de um suco por extração através de vapor.

O conteúdo de antocianinas em suco de amora também é influenciado pelo tempo e temperatura de armazenamento. Estudos com elaboração de suco e armazenamento por dois meses, reduziu significativamente com relação ao teor inicial (PLADA et al., 2008).

Com base nos valores relatados na literatura sobre o conteúdo de antocianinas, e a grande variação entre os diferentes materiais genéticos, existe um

grande potencial na produção de amora-preta visando a obtenção de corante natural para a indústria alimentícia e de medicamentos (Embrapa Clima Temperado, 2008).

Os compostos presentes nos extratos de amora-preta são absorvidos, metabolizados e distribuídos nos tecidos quando da sua ingestão. Estudos demonstram que as antocianinas são rapidamente absorvidas pelo intestino delgado, e após, são metabolizadas e excretadas na bile e urina na forma intacta, metiladas e/ou glicuronizadas (TALAVERA et al., 2004). Em ratos, estes compostos podem ser encontrados nos tecidos do estômago, jejuno, fígado, rins, cérebro e plasma (TALAVERA et al., 2005). Nos humanos, estes compostos são encontrados na urina, tanto na forma intacta, quanto em alguns metabolitos metilados, glicuronizados, sulfoconjugados, e aglicones (FELGINES et al., 2005).

Os compostos não flavonóides incluem (MELO; GUERRA, 2002):

a) Derivados das estruturas químicas C6-C1, incluindo os compostos hidroxibenzóicos, como os representados pelos ácidos p-hidroxibenzóico, gálico e elágico (Figura 3).

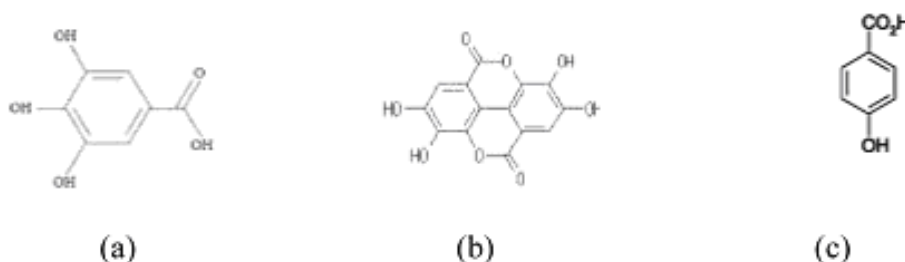


Figura 3. Estrutura química do ácido gálico (a), ácido elágico (b) e ácido p-hidróxibenzóico (c)

Fonte: Malacrida e Motta, 2006.

b) Derivados das estruturas químicas C6-C3, incluindo os compostos hidroxicinâmicos, representados pelos ácidos caféico e p-cumárico (Figura 4).

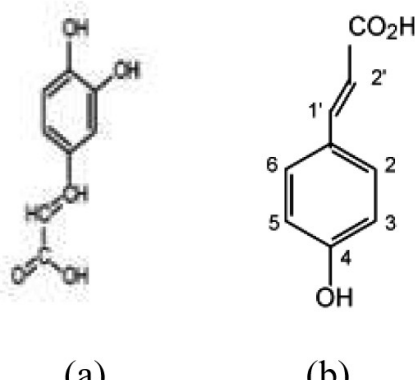


Figura 4. Estrutura química do ácido caféico (a) e do ácido p-cumárico (b)

Fonte: Filho, Pereira e Bayma, 2005.

c) Derivados das estruturas químicas C6-C2-C6, que são específicas do trans- e do cis- resveratrol (Figura 5).

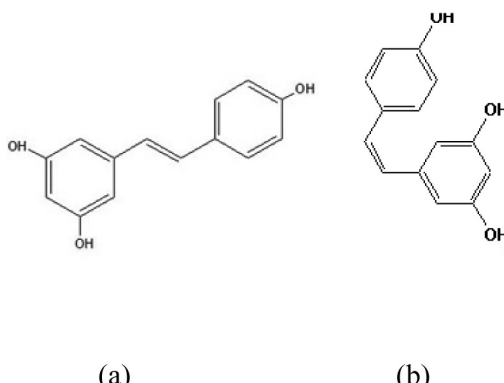


Figura 5. Estrutura química do trans resveratrol (a) e do cis-resveratrol (b)

Fonte: Filho, Pereira e Bayma, 2005

A atividade antioxidante dos não-flavonóides está relacionada com a posição dos grupos hidroxilas e também com a proximidade do grupo $\text{-CO}_2\text{H}$ com o grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta. Em geral, a atividade antioxidante dos derivados dos ácidos hidrocinâmicos é maior do que a dos ácidos hidrobenzóicos. A presença do grupo -CH=CH-COOH na estrutura do ácido cinâmico aumenta sua capacidade de estabilizar radicais livres. Provavelmente, há conjugação da dupla ligação do grupo -CH=CH-COOH com as duplas do anel. Deve-se destacar que o ácido gálico apresenta atividade antioxidante maior do que a catequina (flavonóide), que conta com cinco grupos hidroxilas em sua estrutura

(RICE-EVANS et al., 1996). A atividade antioxidante do ácido caféico é próxima a do ácido m-cinâmico, apesar de apresentar a mais um grupo hidroxila. Esse grupo na posição para do ácido p-cumárico lhe proporciona maior atividade antioxidante quando comparado com o ácido hidrocinâmico.

Relatos da literatura demonstram uma variabilidade no conteúdo de compostos fenólicos totais em amora-preta de 261,95 a 929,62 mg equivalente de ácido gálico.100g⁻¹de fruta fresca (Embrapa Clima Temperado, 2008), 569,89mg ác. gálico.100g⁻¹fruta (CHIM, 2008), até 1938,70 mg ácido galico.100g⁻¹fruta (JACQUES, 2009). Esta variabilidade no conteúdo de fenóis pode estar relacionado a diferença de metodologias empregadas na extração da amostra para a determinação dos fenóis totais, pela diferença de safra, clima ou pela localização das plantas.

Comparando a amora-preta com outras frutas da mesma família botânica, como a framboesa (30 mg ácido galico.100g⁻¹fruta) e morango (80 mg ácido galico.100g⁻¹fruta) (AGAR; STREIF; BANGERTH, 1997), observa-se que a amora-preta compreende maior conteúdo de compostos fenólicos totais.

Estudos anteriores encontraram na amora-preta os seguintes compostos fenólicos da classe dos não flavonóides: ácido gálico, ácido hidroxibenzóico, cafeico, cumárico, ferúlico, elágico (SELLAPPAN; AKOH; KREWER, 2002). De acordo com Siriwoharn e Wrolstad (2004), além dos ácidos gálico, elágico encontrados por Sellappan, Akoh e Krewer (2002) foram identificados também a quercetina e kampferol. Jacques (2009), identificou o ácido elágico e o kampferol. Estas diferenças na constituição dos compostos fenólicos podem ocorrer pela diferenciação de espécie e cultivar, já que os primeiros autores utilizaram amora Marion (*Rubus* sp. hyb) e Evergreen (*Rubus laciniatus*), e a amora-preta avaliada no estudo de Jacques (2009), foi a da espécie *Rubus fruticosus*.

Estudos realizados por Jacques (2009) relatam que o ácido gálico foi o ácido fenólico predominante na amora-preta cultivar Tupy, compreendendo 64% do total dos ácidos fenólicos identificados. Estes dados estão de acordo com os resultados reportados por Chim (2008), que também descreve o ácido gálico como sendo o ácido fenólico predominante, com cerca de 60% dos ácidos fenólicos identificados. Estes resultados confirmam dados da literatura que reportam o ácido gálico como sendo o ácido fenólico de maior expressão dentre os compostos fenólicos identificados em amora-preta (SINGLETON; ROSSI, 1996).

De acordo com estudos de estabilidade de compostos fenólicos na amora-preta frente ao armazenamento congelado realizado por Jacques (2009), observou-se que o ácido gálico apresentou uma das maiores taxas de degradação dentre os compostos fenólicos individuais, talvez pela associação com sua estrutura altamente hidroxilada, que favorece maior disponibilidade para reações de oxi-redução.

3.2 Ácido Ascórbico

A vitamina C, ou ácido L-ascórbico (AA), é uma vitamina hidrossolúvel e termolábil. O AA é amplamente distribuído nos vegetais e em produtos de origem vegetal, sendo encontrado, principalmente, em frutas cítricas e hortaliças folhosas (ZHANG; HAMAUZU, 2004).

O AA encontra-se na natureza sob a forma reduzida, denominada de ácido L-ascórbico, ou na forma de ácido L-dehidroascórbico (DHA), que consiste no produto primário do processo de oxidação do anel lactona do ácido L-ascórbico; porém, a forma oxidada apresenta-se em menores quantidades nos compostos naturais. A transformação do AA em DHA ocorre normalmente no interior do organismo, e como é reversível, permite que uma destas formas possa ser transformada na outra (Figura 6). Essa capacidade de conversão atua como um sistema oxido-redutor, que é capaz de transportar hidrogênio no processo de respiração ao nível celular (WELCH et al., 1995; TAVARES et al., 2000).

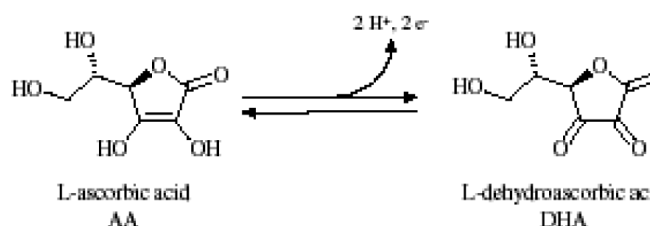


Figura 6. Oxi-redução do ácido L-ascórbico

Fonte: Silva, Lopes e Valente-Mesquita, 2006

O ácido L-dehidroascórbico (DHA) também apresenta atividade vitamínica, pois é facilmente reduzido no organismo, e apresenta cerca de 80% da atividade vitamínica do AA. A atividade antioxidante da vitamina C envolve a doação de um elétron e a formação do radical livre ascorbato (ROSA et al., 2007).

O teor de vitaminas nas frutas pode variar dependendo da espécie, do estágio de maturação na época da colheita, de variações genéticas, do manuseio pós-colheita, das condições de estocagem e do processamento (SILVA; LOPES; VALENTE-MESQUITA, 2006). De acordo com Wang e Lin (2000) existem poucas informações sobre a capacidade anti-oxidante de frutos em diferentes estádios de desenvolvimento. Esses autores observaram que em estádios de maturação mais avançados de alguns frutos, tais como amora, morango e framboesa, ocorre um aumento na capacidade anti-oxidante destes frutos. Apesar desse aspecto nutricional relevante relacionando grau de maturação e propriedades anti-oxidantes, normalmente o estágio de maturidade do fruto é baseado apenas na avaliação da cor superficial dos frutos (WANG; LIN, 2000).

De acordo com Jacques (2009), o conteúdo de ácido ascórbico presente na amora-preta (0,9 mg ácido ascórbico.100g⁻¹ fruta) é baixo quando comparado com outras frutas estudados por Hernández, Lobo e Gonzáles (2006) e Araújo et al., (2007), como do conteúdo no mamão papaya (86,0 mg ácido ascórbico.100g⁻¹ fruta), na manga (89,0 mg ácido ascórbico.100g⁻¹ fruta) e na acerola (183mg.100g⁻¹). Chim (2008), relata teores de 2,4 mg ácido ascórbico.100g⁻¹ fruta na amora-preta cv. Tupy, resultado superior ao encontrado no estudo de Jacques (2009).

Estudos realizados por Pantelidis et al. (2007), relatam grandes variações nos teores de vitamina C em diversas cultivares de amora-preta e framboesa, ambas da família botânica Rosaceae e gênero *Rubus*, na faixa de 14,3 à 103,3 mg ácido ascórbico.100g⁻¹ fruta fresca.

Chim (2008), concluiu em seu estudo que frutos de amora-preta possuem teores de vitamina C pouco expressivos. Apesar de ser considerado um fruto rico em compostos com ação antioxidante, a amora-preta não seria indicada como única fonte para suprir as necessidades diárias de vitamina C.

No processamento da amora-preta na forma de polpa, não se observou degradação da vitamina C, na forma de ácido L-ascórbico (0,9 mg ácido ascórbico.100g⁻¹ fruta), além de não apresentar diferença ao nível de 5% de significância após 4 meses de armazenamento nas temperaturas de -10 e -18°C. No entanto, aos 6 meses de armazenamento, observou-se a degradação total dessa vitamina, inclusive na polpa armazenada a -80°C (JACQUES 2009).

3.3 Tocoferóis

A vitamina E consiste na denominação genérica de oito compostos lipossolúveis, o alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ)- tocoferóis, além do α , β , γ e δ -tocotrienóis, cada um com atividades biológicas específicas; porém, o α - tocoferol é o composto que apresenta maior atividade como antioxidante (BIANCHINI; PENTEADO, 2003; BALL, 1998).

Os tocoferóis (Figura 7) ocorrem naturalmente em praticamente todos os vegetais, principalmente nos vegetais verde-escuros, nas sementes oleaginosas, nos óleos vegetais e no germem de trigo. Os tocotrienóis são encontrados apenas em um pequeno grupo de vegetais, como em algumas variedades de palma. A ocorrência natural dos diferentes compostos que fazem parte da vitamina E diferenciam-se entre os vegetais, mas o α - tocoferol tem ocorrência mais comum (SETIADIA, 2003).

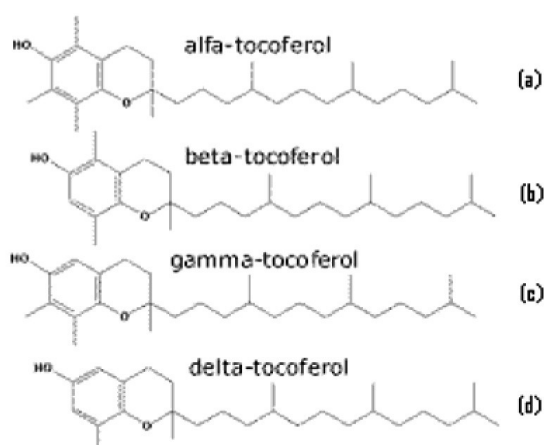


Figura 7. α -tocoferol (a); β -tocoferol (b); γ -tocoferol (c); e δ - tocoferol (d).

Fonte: Vitamina E, 2005.

A rota da vitamina E no organismo segue o caminho geral de um antioxidante lipídico na estabilização de membranas subcelulares, mas se tem observado que estes compostos participam também de outras atividades vitamínicas (DÍAZ, 2007; SIQUEIRA, 1997). A função da vitamina E como antioxidante na peroxidação das membranas celulares ocorre pelo fornecimento de um átomo de hidrogênio ao radical peróxido formado, agindo como seqüestrante de radicais livres, protegendo assim as membranas celulares de possíveis danos (SIQUEIRA, 1997).

A vitamina E apresenta pouca resistência ao aquecimento e à ação de ácidos, sendo instável na presença de agentes alcalinos, da luz ultravioleta e do oxigênio. Essa vitamina é destruída quando em contato com gorduras rançosas, e com os metais chumbo e ferro. Como são insolúveis em água, não há perda por lixiviação durante o processo de cocção (RICE-EVANS; MILLER, 1995).

A vitamina E é encontrada principalmente em produtos que apresentam alto teor em gordura, como amêndoas, óleos vegetais e algumas frutas e vegetais (LINS, 2006). A amora-preta apresenta quantidades muito pequenas de tocoferóis (0,870 mg tocoferol.100g⁻¹fruta fresca), o que pode ser explicado pela baixa quantidade de gordura presente nesta fruta (JACQUES, 2009).

De acordo com Chim (2008), as cultivares de amora-preta Guarani e Brazos apresentam quantidades de tocoferóis semelhantes (0,468 mg tocoferol.100g⁻¹fruta 0,537 mg tocoferol.100g⁻¹fruta, respectivamente); porém, apresentam quantidades inferiores aos dados relatados por Chun et al., (2006) para a amora-preta (1,43 mg tocoferol.100g⁻¹ fruta).

Os dados de quantificação de tocoferóis em amora-preta são escassos, porém comparando o conteúdo de tocoferóis na amora-preta cultivar Tupy (0,87 mg.100g⁻¹) (Jacques, 2009), observa-se uma similaridade com o conteúdo de outras frutas, como no figo (0,76 mg tocoferol.100g⁻¹fruta), nectarina (0,73 mg tocoferol.100g⁻¹ fruta) e mirtilo (1,05 mg tocoferol.100g⁻¹ fruta) (CHUN et al., 2006), e no tomate (0,89 mg tocoferol.100g⁻¹ fruta) (LEE et al., 2000).

3.4 Carotenóides

Os carotenóides constituem um dos mais importantes grupos de pigmentos na natureza, devido às suas numerosas funções, larga distribuição e diversidade estrutural (OLIVER; PALOU, 2000). Uma das suas principais funções é a atividade provitamínica A. A vitamina A é essencial para a diferenciação celular, para a visão, para o crescimento ósseo, na reprodução e na integração do sistema imunológico, sendo que sua deficiência pode resultar em anemia (LAYRISSE, 2000).

Os carotenóides compreendem uma família de compostos naturais, dos quais mais de 600 variantes estruturais estão reportadas e caracterizadas, a partir de bactérias, algas, fungos e plantas superiores (FONTANA et al., 1997). A estrutura

química dos carotenóides é baseada em uma cadeia de carbonos com a presença de ligações duplas, compartilhadas ou não. Estas ligações duplas características fazem desses compostos potenciais antioxidantes, uma vez que suas moléculas são capazes de receber elétrons de espécies reativas, neutralizando os radicais livres.

Estes compostos constituem-se em pigmentos comumente presentes em alimentos de origem vegetal, sendo responsáveis pelas colorações amarela, alaranjada e vermelha. Os carotenóides também ocorrem em vegetais folhosos, que na sua grande maioria são verdes devido a presença da clorofila, que é o pigmento predominante (CTENAS; VITOLO, 2000).

Na amora-preta, devido ao elevado conteúdo de antocianinas totais, a coloração amarelada característica da presença de carotenos não é representativa como em outras frutas. O conteúdo de carotenóides totais em amora-preta (0,877 mg β -caroteno.100g⁻¹ de fruta) é reportado como sendo superior ao da acerola (0,53 mg de β -caroteno.100g⁻¹ de fruta) que, assim como a amora-preta tem uma predominância de antocianinas (ARAÚJO et al., 2007). De acordo com Marinova e Ribarova (2007), a amora-preta apresenta vários carotenóides, incluindo a luteína (0,3 mg.100g⁻¹ de fruta), zeaxantina (29,0 mg.100g⁻¹ de fruta), β -criptoxantina (30,1 mg.100g⁻¹ de fruta), α -Caroteno (9,2 mg.100g⁻¹ de fruta) e β -caroteno (101,4 mg.100g⁻¹ de fruta). Jacques (2009) relata a presença em amora-preta cv. Tupy de β -criptoxantina (0,227 mg.100g⁻¹ de fruta), luteína+zeaxantina (0,519 mg.100g⁻¹ de fruta), β -caroteno (0,003 mg.100g⁻¹ de fruta) e licopeno (0,015 mg.100g⁻¹ de fruta).

4 Considerações Finais

Através desta revisão, percebe-se que a inclusão de frutas como a amora-preta, seja na forma *in natura* ou processadas como sucos, geléias e sorvetes, no hábito alimentar, tem efeito benéfico sobre a saúde das pessoas, acarretando numa forte tendência de aumento do consumo em quase todo o mundo. Assim a indústria atenta às exigências e tendências do mercado, vem cada vez mais buscando alternativas e formas de processamento, a fim de oferecerem um produto saudável, de boa apresentação, preservando com integridade suas propriedades nutricionais.

A amoreira-preta possui grandes possibilidades de atingir o mercado destinado a frutas de mesa, principalmente realçando a ausência da utilização de agroquímicos na fase de produção e qualidades intrínsecas ao fruto como a presença de ácido elágico. Entre os antioxidantes presentes na amora-preta, os mais ativos e freqüentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonóides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de seqüestrar os radicais livres. Além dos compostos fenólicos, outros componentes possuem atividade antioxidante, estão todos presentes na amora-preta, como: as vitaminas C e E e os carotenóides.

Referências

- AGAR, I. T.; STREIF, J.; BANGERTH, F. Effect of high CO₂ and controlled atmosphere (CA) on the ascorbic and dehydroascorbic acid content of some berry fruits. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 47-55, 1997.
- AJILA, C. M.; NAIDU, K. A.; BHAT, S. G.; PRASADA RAO, U. J. S. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chem.*, London, v. 105, n. 3, p. 982, 2007.
- ANTUNES, L. E. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 151-158, 2002.
- ANTUNES, L. E.; RASEIRA, M. C. B. *Aspectos técnicos da cultura da amora-preta*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 54 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 122).
- ARAÚJO, P. G. L.; FIGUEIREDO, R. W.; ALVES, R. E.; MAIA, G. A.; PAIVA, J. R. β -caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira conservada por congelamento durante 12 meses. *Ciênc. e Tec. de Aliment.*, Campinas, v. 27, n. 1, p. 104-107, 2007.
- AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Jour. of Food Composition and Analysis*, Orlando, v. 17, n. 3, p. 385-396, 2004.
- BALL, G. F. M. *Bioavailability and analysis of vitamin in foods*. Chapman & Hall: London, U.K. p. 195-239, 1998.
- BIANCHINI, R.; PENTEADO, M. V. C. *Vitamina E. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. Barueri: Manole, p. 23-164, 2003.
- 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. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CHUN, J.; LEE, J.; YE, LIN; EXLER, J.; EITENMILLER, R. R. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Jour. of Food Composition and Analysis*, Orlando, v. 19, n. 2/3, p. 196-204, 2006.

CTENAS, A.; VITOLO, M. R. *Crescendo com saúde*. São Paulo: C2 editora e consultoria em nutrição, 2000. Disponível em: <<http://www.crescendocomsaude.com.br>>. Acesso em: 09 out. 2008.

DAUBENY, H. A. Brambles. In: JANICK, J. E.; MOORE, J. N. (Ed.). *Fruit breeding*. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 109-190.

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

DÍAZ, T. G. Chemometrics for the resolution of co-eluting peaks of β - and γ -tocopherols in RP-HPLC: Determination in edible oils and dietary supplements. *Food Chem.*, Spain, v. 105, n. 4, p. 1583-1590, 2007.

DING, M.; FENG, R.; WANG, S.Y.; BOWMAN, L.; LU, Y.; QIAN, Y.; CASTRANOVA, V.; JIANG, B-H.; SHI, X. Cyanidin-3-glucoside, a Natural Product Derived from Blackberry, Exhibits Chemopreventive and Chemotherapeutic Activity. *Jour. of Biological Chem.*, Maryland, v. 281, n. 25, p. 17359-17368, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Embrapa Clima Temperado Sistemas de Produção. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 10 set. 2008.

FAN-CHIANG, H-J.; WROLSTAD, R. Anthocyanin pigment composition of blackberries. *Jour. of Food Science*, Chicago, v. 70, n. 3, p. 198-202, 2005.

FELGINES, C.; TALAVERA, S.; TEXIER, O.; GIL-IZQUIERDO, A.; LAMAISSON, J-L.; REMESY, C. Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *Jour. of Agricultural and Food Chem.*, Washington, v. 53, n. 20, p. 7721-7727, 2005.

FILHO, S.; PEREIRA, A. P. S.; BAYMA, J. C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. *Planta Daninha*, Londrina, v. 23, n. 1, p. 25-32, 2005.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D.S.; PERACETTA, L. F.; PASSOS, M. *Carotenóides cores atraentes e ação biológica*. 11º prêmio paranaense em C&T 1997. Disponível em: <<http://www.herbario.com.br/dataherb06/1112carotenoid.htm>>. Acesso em: 10 set. 2008.

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. *Food Science and Nutrition*, Amherst, v. 28, n. 4, p. 273-314. 1989.

HERNANDÉZ, Y.; LOBO, M. G.; GONZÁLES, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chem.*, London, v. 96, n. 4, p. 654-664, 2006.

JACQUES, A. C. *Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (Rubus fruticosus) cv.tupy*. 2009. Dissertação 49f. (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

KRINSKY, N. I. Carotenoids as chemopreventive agents. *Preventive Medicine*, San Diego, v. 18, n. 5, p. 592-602, 1989.

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

LAYRISSE, M. New property of vitamin A and β -carotene on human iron absorption: effect on phytate and polyphenols as inhibitors of iron absorption. *Arch. Latinoam. Nutr.*, Guatemala, v. 50, n. 3, p. 243-248, 2000.

LAZZE, M. C.; SAVIO, M.; PIZZALA, R.; CAZZALINI, O.; PERUCCA, P.; SCOVASSI, A. I.; STIVALA, L. A.; BIANCHI, L. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis*, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1427-1433, 2004.

LEE, J.; YE, L.; LANDEN, W. O.; EITENMILLER, R. R. Optimization of an extraction procedure for the quantification of vitamin e in tomato and broccoli using response surface methodology. *Jour. of Food Composition and Analysis*, Orlando, v.13, n. 1, p. 45-57, 2000.

LINS, R. T. *Determinação de tocoferóis e carotenóides em frutas amazônicas: Implantação de uma metodologia*. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro Tecnológico. Universidade Federal do Pará, Pará.

MAAS, J. L.; GALLETTA, G. J.; STONER, G. D. Ellagic acid, na anticarciogen in fruits, especially in strawberry: a review. *HortScience*, Alexandria, v. 26, n. 1, p. 10-14. 1991.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. da. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. *B. Ceppa*, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F.; HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, n. 5, p.370-374; 2007.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Ciênc. e Tec. de Aliment.*, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MOREIRA, A.V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 17, n. 4, p. 411-240, 2004.

MOTA, R. V. Caracterização do suco de amora-preta elaborado em extrator caseiro. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n. 2, p. 303-308, 2006a.

MOTA, R. V. Caracterização física e química de geléia de amora-preta. *Ciênc. e Tec. de Aliment.*, Campinas, v. 26, n. 3, p. 539-543, 2006b.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal Chromat. A.*, Washington, v. 1054, n. 1/2, p. 95-111, 2004.

NACHTIGALL, A. M.; SOUZA, E. L. de; MALGARIM, M. B.; ZAMBIAZI, R. C. Geléias light de amora-preta. *B. Ceppa*, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 337-354, 2004.

NETZEL, M.; STRASS, G.; KAUL, C.; BITSCH, I.; DIETRICH, H.; BITSCH, R. In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice. *Food Research International*, Canada, v. 35, p. 213-216, 2002.

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 881, n. 1, p. 543-555, 2000.

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

PLADA, G. M.; JACQUES, A. C.; PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T.; ZAMBIAZI, R. C.

Conteúdo de fitoquímicos em suco de amora-preta (*Rubus spp.*) armazenado sob diferentes temperaturas. In: CONGRESSO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 2., 2008, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: [s.n.], 2008.

POLING, E. B. Blackberries. *Journal of Small Fruit and Viticulture*, Baton Rouge, v. 14, n. 1/2, p. 38-69. 1996.

PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr.*, Arkansas, v. 78, n. 3, p. 570-578, 2003.

REYES-CARMONA, J.; YOUSEF, G. G.; MARTÍNEZ-PENICHE, R. A.; LILA, M. A. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus sp.*) produced in different climatic regions. *Jour. of Food Science*, Chicago, v. 70, n. 7, p. 497-503, 2005.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J. Antioxidants – the case for fruit and vegetables in the diet. *British Food Journal*, Bradford, v. 91, n. 9, p. 35-40, 1995.

RICE-EVANS, C.; NICOLAS, J.; MILLER, J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, London, v. 20, n. 3, p. 933-956, 1996.

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

SANTOS, A. M.; RASEIRA, M. C. B.; MADAIL, J. C. M. *A cultura da amora-preta*. Brasília: Embrapa SPI, 1997. 61 p. (Coleção Plantar, 33).

SEERAM, N. P.; 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. *Jour. of Agric. and Food Chem.*, Washington, v. 54, n. 25, p. 9329-9339, 2006.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, Washington, v. 50, n. 8, p. 2432-2438, 2002.

SERRAINO, I.; DUGO, L.; DUGO, P.; MONDELLO, L.; MAZZON, E.; DUGO, G.; CAPUTI, A. P.; CUZZOCREA, S. Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. *Life Sciences*, Amsterdam, v. 73, p. 1097-1114, 2003.

SETIADIA, D. H. Vitamin E models. Shortened side chain models of α , β , γ and δ tocopherol and tocotrienol: a density functional study. *Jour. Mol Struct.*, Amsterdam, v. 637, n. 1/3, p. 11-26, 2003.

SEVERO, J.; GALARÇA, S. P.; AIRES, R. F.; CANTILLANO, R. F. F.; ROMBALDI, C. V.; SILVA, J. A. Avaliação de compostos fenólicos, antocianinas, vitamina C e capacidade antioxidante em mirtilo armazenado em atmosfera controlada. *Braz. Jour. Food Technol.*, Pelotas, II SSA, 2009. Edição Especial.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. *Rev. Food Science Nutr.*, Curitiba, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAHIDI, F.; MARIAN, N. Phenolics in food and nutraceuticals. In: RABAH, T. M.; KHALIL, I. E.; HOWARD, L. Effect of ascorbic acid and dehydration on concentrations of total phenolics, antioxidant capacity, anthocyanins, and color in fruits. *Jour. of Agric. and Food Chem.*, Davis, v. 53, n. 11, p. 4444-4447, 2003.

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

phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, California, v.16, n. 3, p. 144-158, 1996.

SIQUEIRA, F. M. Nutrientes antioxidantes. *Ciênc. e Tec. Agro.*, Campinas, v. 31, n. 2, p. 192-199, 1997.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E. Polyphenolic composition of marion and evergreen blackberries. *Jour. of food Science*, Davis, v. 69, n. 4, p. 233-240, 2004.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A. R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.*, Davis, v. 89, n. 4, p. 191-198, 2005.

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

TALAVERA, S. V.; FELGINES, C.; TEXIER, O.; BESSON, C.; GIL-IZQUIERDO, A.; LAMAISON, J.-L.; REMESY, C. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *Jour. of Agr. and Food Chem.*, Washington, v. 53, n. 10, p. 3902-3908, 2005.

TATE, P.; GOD, J.; BIBB, R.; LU, Q.; LARCOM, L. L. Inhibition of metallo proteinase activity by fruit extracts. *Cancer Letters*, Oxford, v. 212, n. 2, p. 153-158, 2004.

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.

TAVARES, J. T. Q.; SILVA, C. L.; CARVALHO, L. A.; SILVA, M. A.; SANTOS, C. M. G. Estabilidade do ácido ascórbico em suco de laranja submetido a diferentes tratamentos. *Magistra*, Cruz das Almas, v. 12, n. 1/2, jan./dez. 2000.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Jour. of Agric. Food Chem.*, Washington, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000.

WANG, S.Y.; JIAO, H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Jour. of Agr. and Food Chem.*, Washington, v. 48, n. 11, p. 5677-5684, 2000.

WANG, S. Y.; MAAS, J. L.; PAYNE, J. A.; GALLETTA, G. J. Ellagic acid content in small fruits mayhaws, and other plants. *Jour. of Small Fruit and Viticulture*, Baton Rouge, v. 2, n. 4, p. 11-49, 1994.

WELCH, R.; WANG, Y.; CROSSMAN JUNIOR, A.; PARK, J. B.; KIRK, K. L.; LEVINE, M. Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. *Jour. Biology Chem.*, U.S.A, v. 270, n. 21, p. 84-92, 1995.

ZHANG, D.; HAMAUZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chem.*, London, v. 88, n. 4, p. 503-509, 2004.

5. CAPITULO II. Chromatographic analyses of bioactive and volatile organic compounds in southern Brazilian blackberry (*Rubus fruticosus*) fruit cv. Tupy

Andressa Carolina Jacques^{1*}, Fábio Clasen Chaves¹, Rui Carlos Zambiasi¹, Márcia Campos Brasil², Elina Bastos Caramão²

¹UFPEl/FAEM, Dept. Ciência e Tecnologia Agroindustrial, C.P. 354, CEP 90010-900, Pelotas, RS, Brazil

²UFRGS/IQ, Dept. Química Inorgânica, CEP: 91501-960, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author - Phone/Fax: + 55 53 32757258; email: andressa.jacques@yahoo.com.br

Abstract

*A quality Brazilian blackberry (*Rubus fruticosus*, cultivar Tupy), an expanding fruit crop in southern Brazil, was found to contain bioactive compounds including gallic acid, (-)-epicatechin, ferulic acid, and quercetin. Among the volatile organic compounds (VOCs) identified in Tupy blackberry are important flavor components of small fruit, including hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, esters, and terpenoids. Some have not been previously found in blackberry such as heptane, toluene, decane, trimethylbenzene, undecane, tetramethylbenzene, dodecane, dimethylundecane, tridecane, tetradecane, pentadecane, hexadecane, heptadecane, nonadecane, eicosane, while others, have been associated with typical blackberry notes.*

Key words: VOC; flavor; phenolic compounds, blackberry.

1 Introduction

Introduced in southern Brazil in the 70's, blackberry (*Rubus fruticosus*) has adapted well to the temperate climate conditions finding high productivity (up to 10,000 kg/ha/year) under little costs of implementation and maintenance (Antunes, 2002; Finn, 2008). The EMBRAPA Pelotas (RS, Brazil) breeding program has released several cultivars including the high quality blackberry cultivar named 'Tupy', currently also been cultivated in Mexico and exported to the United States. 'Tupy' is a cross between cv. Comanche and an unknown clone called 'Uruguay' proceeding from that country (Antunes, 2002; Finn, 2008).

Blackberry fruits find different consumable forms such as fresh or processed, which may include frozen, dried, jam, cake, marmalade, ice-cream, juice, wine, and liqueur (Antunes, 2002; Finn, 2008).

Flavor is a crucial quality attribute for product acceptance. Volatile compounds are important components of fruit flavor, as well as, the balance between acids and sugars is directly related to the delicate flavors of fruits (Turemis, Kafkas, Kafkas, Kurkcuoglu, & Baser, 2003). Fruit metabolism during ripening, postharvest handling, and storage is determinant for flavor volatile production and is also dependent on factors such as maturation stage and plant species (Christensen, Edelenbos, & Kreutzmann, 2007; Riu-Aumatell, Castellari, López-Tamames, Galassi, & Buxaderas, 2004). Nowadays, various methods are available for aroma analysis including solvent extraction and techniques for pre-concentrating volatiles such as solid-phase micro extraction (SPME) (Turemis et al., 2003; Riu-Aumatell et al., 2004; Augusto, Valente, Tada, & Rivellino, 2000). Although many studies have analyzed volatiles from different *Rubus* species (Kallio & Linko, 1973; Malowicki, Martin, & Qian, 2008; Malowicki, Martin, & Qian, 2008b; Meret, Brat, Mertz, Lebrun, & Gunata, 2011; Pyysalo, 1976) and from different blackberry cultivars (Du, Finn, & Qian, 2010; Du, Finn, & Qian, 2010b; Du, Finn, & Qian, 2010c; Du, Kurnianta, McDaniel, Finn, & Qian, 2010d; Georgilopoulos & Gallois 1987; Klesk & Qian, 2003; Klesk & Qian, 2003b; Wang, Finn, & Qian, 2005) no one has looked into the volatiles produced by Brazilian blackberry fruit cv. Tupy.

Fruit contribution to human health goes beyond supplying essential nutrients for nourishment but include a diverse array of bioactive secondary metabolites from fruit extracts such as phenolic compounds, tocopherols, ascorbic acid that have been

implicated in the prevention of cardiovascular diseases and cancers (Seeram et al., 2006).

As part of an effort to increase consumer acceptance through the increased knowledge of quality attributes, as well as a support to breeders for improvement of fruit quality, of this expanding fruit crop, this study reports the main bioactive and volatile compounds identified in 'Tupy' blackberry.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

Blackberry (*Rubus fruticosus*) fruits of cultivar Tupy were handpicked at maturity in November of 2009 from a local grower at Morro Redondo RS, Brazil, and stored at -80°C for further analyses. At harvest fruit presented 11.2° brix and titratable acidity of 0.97% of malic acid equivalents.

SPME (Supelco, Bellefonte, PA, USA) DVB/CAR/PDMS 50/30 fibers were used for sample volatile collection. The fibers were conditioned prior to use according to supplier's instructions.

All chemicals were GC or HPLC grade, purchased either from Sigma (Saint Louis, MO, USA) or Fluka (Milwaukee, WI, USA), except for β -cryptoxanthin, lycopene, lutein and zeaxanthin, purchased from Chromadex (Irvine, CA, USA).

2.2 HPLC analyses of bioactive compounds

All bioactive compound analyses were performed using a Shimadzu HPLC, with FL and UV detectors, a CLC-GODS guard column and a Shimadzu RP-18 CLC-ODS (5 μ m x 4.6 mm x 150 mm) column at 25°C.

Phenolic compounds

Phenolic compound extraction followed methodology described by Hakkinen, Karenlampi, Heinonen, Mykkanen & Torronen (1998). Briefly, 5 g of sample was ground up in liquid nitrogen, dissolved in methanol (30 mL) and acidified with HCl (1.2 M). The extract was incubated in a water bath at 35°C, in the dark for 24 h. The mixture was filtered and concentrated to dryness. The residue was redissolved in

methanol (5 mL), centrifuged at (7.000 rpm for 10 min) and 30 μ L of the supernatant was injected in the HPLC system. HPLC gradient separation used mobile phase A (water:acetic acid, 99:1) and B (methanol), at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. The gradient started at 100% A and linearly changed to 60% A and 40% B at 25 min, then at 37 min to 95% A and 5% B until 42 min and back to the initial conditions in 3 min. UV detector was set at 280 nm. Total run time was 45 min.

Compound identification was based on retention time comparison to the following standards: caffeic acid, ferulic acid, gallic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, quercetin and (-)-epicatechin. Quantification was based on calibration curve of standards.

Carotenoids

Carotenoid extraction was performed according to methodology described by Rodriguez-Amaya (2001). Sample (5 g) was ground with 2 g of celite and cold acetone was then added, and the mixture was stirred for 10 min. The sample was filtered under vacuum and acetone was used to wash the material until the filtrate passing through the funnel became clear. The extract was partitioned using 30 mL of petroleum ether and 100 mL of distilled water. The organic phase was washed three more times and then transferred to a volumetric flask and the volume was brought to 50 mL with petroleum ether. 25 mL of the sample solution was saponified using potassium hydroxide (1.5 N in ethanol) in the dark for 18 h. Upon phase separation the extract was concentrated to residue and resuspended in the HPLC initial mobile phase (methanol:acetonitrile, 30:70 v/v). The extract was centrifuged at 9000 rpm for 6 min and a 25 μ L aliquot was injected in the HPLC.

HPLC gradient separation used mobile phase (A - methanol, B - acetonitrile e C - ethyl acetate) at a flow rate of 0.9 mL min⁻¹. The gradient started at 30% A and 70% B and linearly changed to 10% A, 80% B and 10% C at 10 min; then at 35 min the solvent ratio was 5% A, 80% B and 15% C until 40 min and back to initial conditions in 2 min. Total run time was 42 min. The UV detector was set at 450 nm. Compound identification was based on retention time comparison to the following standards: β -cryptoxanthin, lycopene, lutein e zeaxanthin, and β -carotene. Quantification was based on external calibration curves.

Tocopherols

Tocopherol extraction was performed according to methodology described earlier for carotenoids (Rodriguez-Amaya, 2001). HPLC gradient separation used methanol (A), acetonitrile (B) and isopropanol (C), at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Gradient started at 40% A, 50% B e 10% C and it was linearly changed to 65% A, 30% B e 5% C at 10 min; it was maintained for 2 min, then back to the initial conditions for a total run time of 15 min. Fluorescence detector was set at an excitation wavelength of 290 nm and emission 330 nm. Compound identification was based on retention time comparison with α -, δ - and γ -tocopherol standards and quantification was based on external calibration curve.

L-Ascorbic acid

L-ascorbic acid extraction was performed according to Ayhan, Yeom, Zhang, and Min (2001). HPLC gradient separation used mobile phase A (water:acetic acid, 99.9:0.1) and B (methanol), at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. The gradient started at 100% A, at 5 min was reduced to 98% A e 2% B, held for 2 min, then back to initial conditions for a total run time of 10 min. The UV detector was set at 254 nm. Compound identification was based on retention time comparison to an L-ascorbic acid standard and quantification was based on an external calibration curve.

2.3. CG-MS analysis of volatile compounds

Chromatographic analyses of volatile compounds were performed in a Shimadzu GCMS-QP5050 equipped with a OV5 column (Ohio Valley Specialty Chemical, USA), (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), using helium as carrier gas (99.99% pure, White Martins, Brazil) at a flow rate of 1 mL/min; and the injection split was set at 1:10. Temperature programming was as follows: oven temperature started at 60°C and then ramped at 5°C/min until 250°C. Both injector and detector were set at 250°C. Mass spectra were obtained in the range of 40 m/z to 400 m/z, scan speed 20 scans/s and 70 eV. Compound identification was based on the compounds' unique fragmentation pattern confirmed by comparisons to the NIST05 library.

Headspace SPME

Fresh fruit (3 g) were ground and placed in a 15 mL vial with 3 mL water and 1 g of sodium chloride (added to increase extraction recovery). The vial was heated up to 60°C for 15 min and the SPME fiber (DVB-CAR-PDMS) was exposed to the headspace during 30 min following methodology described by Augusto et al. (2000). Sample injection was performed placing the SPME fiber for 5 min in the heated chromatograph injection port.

Solvent extraction

20 g of ground fruit was dissolved in 100 mL of hexane and acetone. The suspension was sonicated for 1 h, and then filtered and concentrated to dryness. The residue was resuspended in 5 mL of the extraction solvent and an aliquot of 0.5 μ L was injected in the GC/qMS system in the same conditions used for volatiles. The differences were only in the temperatures: injector and detector were maintained at 300 °C and the oven was heated from 70 °C to 280 °C at 10 °C/min.

3. Results and Discussion

Bioactive compounds

Table 1 shows the quantified bioactive compounds found in ‘Tupy’ blackberry grown in Southern Brazil. Two other blackberry species *Rubus glaucus* and *R. adenotrichus* were reported to contain phenolic compounds including gallic acid, ellagic acid, (-)-epicatechin, kaempferol, and ferulic, caffeic, and *p*-coumaric acid esters as minor components (Mertz, Cheynier, Gunata, & Brat, 2007). ‘Marion’ (*Rubus* sp. hyb) and ‘Evergreen’ (*R. laciniatus*) blackberry also had phenolic compounds including ellagic acid, gallic acid, quercetin and kaempferol (Siriwoharn and Wrolstad, 2004). *Rubus fruticosus* cv. Tupy from Southern Brazil had all the previously found phenolic compounds, with gallic acid (145 mg 100g⁻¹) and (-)-epicatechin (94 mg 100g⁻¹) being the predominant ones, while ellagic acid and kaempferol if present were below detection limits. ‘Tupy’ blackberry had a small amount of tocopherols (Table 1), which can be partially explained by the low fat content of this fruit (Jacques, Pertuzatti, Barcia, Zambiasi, & Chim, 2010). The δ - and

α -tocopherol peaks were well resolved; however, β - and γ -tocopherol did not separate under the used chromatographic conditions, and were therefore quantified together. Ascorbic acid levels varied from 14.3 to 17.5 mg 100 g⁻¹ fw in *R. fruticosus* cultivars (Pantelidis, Vasilakakis, Manganaris, & Diamantidis, 2007).

Carotenoids are among the most important pigments accumulated in fruits and may serve in some cases as insect attractants and/or as precursors for VOCs (Tieman et al., 2006; Lewinsohn et al., 2005). For example, VOCs such β -ionone and geranylacetone, responsible for the menthol odor of flowers and mature fruit, are produced from the degradation of β -carotene and lycopene, respectively (Stevens, Kader, & Albright, 1979). Although both β -carotene and lycopene were found in this study, their content was very low (Table 1).

Table 1. Content of bioactive compounds in blackberry cv. Tupy

Compounds	Concentration (mg 100g ⁻¹ f.w. $\pm$ std deviation)
hydroxybenzoic acid	1.44 $\pm$ 0.2
gallic acid	145.85 $\pm$ 3.1
quercetin	20.62 $\pm$ 0.9
caffeic acid	1.69 $\pm$ 0.3
ferulic acid	22.09 $\pm$ 1.2
(-)-epicatechin	94.29 $\pm$ 4.1
δ -tocopherol	0.49 $\pm$ 0.03
(β + γ)-tocopherol	0.24 $\pm$ 0.02
α -tocopherol	0.12 $\pm$ 0.01
L-ascorbic acid	0.90 $\pm$ 0.02
β -cryptoxanthin	0.24 $\pm$ 0.1
lutein + zeaxanthin	0.51 $\pm$ 0.3
β -carotene	0.003 $\pm$ 0.001
Lycopene	0.015 $\pm$ 0.002

Volatile organic compounds

Table 2 shows all 45 volatile compounds identified in blackberry collected with SPME. The identified compounds represented approximately 77% of the total area of the chromatogram (Fig. 1), of which the vast majority (97.7%) was composed of terpenoids with limonene being the predominant compound (Table 2). Identified volatiles extracted with hexane were mainly hydrocarbons (Table 3) and those extracted with acetone were furans and pyrans (Table 4). Near 60% of the total peak area of the chromatogram of hexane (Fig. 2) extracted volatiles were identified and most of the compounds were aliphatic while only 13% were aromatic. In the

chromatogram of the acetone (Fig. 3) extract the identified compounds represented 82% of the total peak area. Of the total volatile organic compounds identified here 32 have been previously identified in blackberry while 5 were found in raspberry and 20 were previously identified in other fruit such as *Juniperus communis*, *Genipa americana*, *Vaccinium angustifolium*, *Fragaria annanasa* (Li, Krewer, Ji, Scherm, & Kays, 2010; Pino, Marbot, & Vazquez-Araujo, Chambers, Adhikari, & Carbonell-Barrachina, 2005; El-Ghorab, Shaaban, El-Massry, & Shibamoto, 2008).

Formation of many volatile compounds increases when metabolism through various biochemical pathways is activated, and is associated to pigment formation during ripening. The major volatiles, responsible for the flavor of small fruits including blackberry are esters, alcohols, ketones, aldehydes, terpenoids, furanones and sulfur compounds (Christensen et al., 2007). Du et al. (2010) identified furaneol, linalool, β -ionone, 2-heptanol and carvone as major compounds contributing for the aroma of 'Marion' and thornless blackberries. In addition, they proposed furaneol, linalool, geraniol, ethyl hexanoate, *trans*-2-hexenol and β -ionone as responsible for fresh fruit, floral, strawberry and raspberry aroma while 1-octen-3-ol, myrtenol, eugenol, and α -terpineol could account for their vegetal, woody, moldy and cooked fruit flavor. 2-heptanol, 1-hexanol, 1-octanol, hexanal, nonanal, 2-decenal, 2-heptanone e methyl salicylate found in 'Tupy' have been previously identified by Meret et al. (2011) in Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.).

According with Meret et al. (2011), excess of 2-heptanol (70 ppm), contributes to the aroma of blackberry. 2-butanone, hexenal, and nonanal were previously identified by Kallio and Linko (1973) in arctic bramble (*Rubus arcticus* L.). Georgilopoulos and Gallois (1988) identified the presence of furfural, 3-methylbutanal, 3-methyl-1-butanol, phenylacetaldehyde and *trans*-furan linalool oxide as the main compounds responsible for the aroma of blackberry juice. Georgilopoulos and Gallois (1987) found alcohols, furans and aldehydes as the predominant chemical classes of all kinds of heated juices, the most abundant compound being 2-heptanol in the cultivated variety and furfural in the wild blackberry varieties. The aroma of fresh blackberries (*Rubus laciniata* L.) is mainly due to the presence of 2-heptanol, *p*-cymen-8-ol, 2-heptanone, 1-hexanol, α -terpineol, pulegone, 1-octanol, isoborneol, myrtenol, 4-terpineol, carvone, elemicine, and nonanal (Georgilopoulos & Gallois, 1987b). Humpf and Schreier (1991) identified benzyl alcohol, benzoic acid, 3-hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol and (Z)-3-hexen-1-ol in blackberry (*Rubus laciniata* L.)

while Pyysalo (1976) found acetic and hexanoic acids, *trans* 3-penten-1-ol, 2-heptanol, 3-methyl-2-buten-1-ol, benzyl alcohol and linalool as volatile compounds in hybrids between raspberry (*Rubus idaeus*, L.) and arctic bramble (*Rubus arcticus*, L.). Juices containing blackberry and other berries presented compounds such as 6-methyl-5-hepten-2-one, α -terpineol, and *E*-nerol (Vazquez-Araujo et al., 2010). Heptanol and *p*-cymen-8-ol have been identified as the most important volatile component of blackberry flavor and their contribution has been described, respectively, as fruity-herbaceous and flowery-spicy (Ibáñez, López-Sebastián, Ramos, Javier, & Reglero, 1998). Du et al. (2010) studied 'Black Diamond', a thornless blackberry cultivar with large fruit size, high yield, considered an industrial standard. 'Marion', however is regarded as having the ideal flavour. Although some variations were present, main differences were regarding concentration. Furanol, linalool, β -ionone, and hexanal were predominant in 'Marion', while in 'Black Diamond', linalool, β -ionone, furaneol, and 2-heptanol were the most important according with odour-activity determined values. Du et al. (2010c) studied the distribution of volatile constituents in ancestral genotypes of 'Marion' blackberry's pedigree investigated over two growing seasons. Each genotype in the pedigree had a specific volatile composition.

Red raspberry was dominated by norisoprenoids, lactones, and acids. Terpenes and furanones were predominant in wild 'Himalaya' blackberry. Raspberry and 'Logan' had a very high concentration of β -ionone. A high content of linalool in 'Olallie' and a low content in 'Chehalem' resulted in a moderate content of linalool in their progeny. However, the concentration of furaneol in 'Marion' was higher than in its parents. β -carotene can be converted to β -ionone and other similar compounds as well as other carotenoids can be converted into linalol and other terpenic aldehydes and ketones. These conversions are concentration dependent and can be affected by the presence of antioxidants including polyphenols (Machado, Bastos, Janzantti, Facanali, Marques, & Franco, 2007). 2-heptanone, geraniol, limonene, linalol, α -pinene and 4-terpineol were also found in raspberries (Malowicki, et al., 2008). Hexanal and (*E*)-2-hexenal can be generated from oxidation or lipoxygenase-catalyzed oxidative degradation of fatty acids (Sanz, Olías, & Perez, 1997), and their concentrations in fruit typically decrease with maturity. Moreover some of the identified volatile compounds have been associated to plant pathogen control. Hexanal, 1-hexanol, (*E*)-2-hexen-1-ol, (*Z*)-6-nonenal, (*E*)-3-nonen-2-one, methyl

salicylate, and methyl benzoate exhibited potential as postharvest fumigants for control of *Botrytis* on strawberry at the lowest level tested and did not cause phytotoxicity. Strawberry, blackberry, and grape metabolized (*E*)-2-hexenal with reduction of the aldehyde to an alcohol and saturation of the carbon-carbon double bond adjacent to the carbonyl, but strawberry yielded more esters as major products (Archbold, Hamilton-Kemp, Barth, & Langlois, 1997). Klesk and Qian (2003b) compared the volatile profiles of Marion (*Rubus* spp. *hyb*) and Evergreen (*R. laciniatus* L.) blackberries finding Marion containing more esters, while the Evergreen containing more alcohols. Wang et al. (2005) studying Oregon and Arkansas grown Chickasaw blackberries (*Rubus* L.) had similar aroma compositions; however, those odorants had various aroma impacts in each region. The compounds with higher flavor dilution factors in Oregon's Chickasaw were ethyl butanoate, linalool, methional, *trans,cis*-2,6-nonadienal, *cis*-1,5-octadien-3-one, and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone, whereas in the Chickasaw grown in Arkansas, they were ethyl butanoate, linalool, methional, ethyl 2-methylbutanoate, β -damascenone, and geraniol. Based on all the previous reports mentioned it can be concluded that the main flavor active compounds already found in *Rubus* spp. are present in southern Brazilian blackberry 'Tupy'. In summary, data presented here reinforces the position of 'Tupy' blackberry as a high quality fruit with potential to be used in a diversity of new products; in addition, further explorations of this cultivar are currently underway and include pre- and post-harvest treatments to optimize postharvest conservation.

Table 2. Volatile compounds identified in blackberry cv. Tupy

peak	RT (min)	area %	Name	MW	S	Class
5	1.68	3.65	methyl ethyl ketone	72	95	Ketone
8	2.06	3.58	Heptane	100	96	Hydrocarbon
9	2.57	0.77	Toluene	92	94	Hydrocarbon
11	2.81	2.05	Hexanal	100	91	Aldehyde
12	3.45	1.52	2-hexenal	98	97	Aldehyde
13	3.65	4.55	Heptanal	114	98	Aldehyde
14	3.98	0.17	2-heptanone	114	98	Ketone
15	4.13	3.24	2-heptanol	116	98	Alcohol
17	4.56	0.17	methyl-hexanoate	130	92	Ester
18	4.65	0.18	α -thujene	136	91	Terpenoid
19	4.80	0.44	α -pinene	136	97	Terpenoid
20	5.11	0.24	Camphene	136	97	Terpenoid
21	5.19	0.23	Heptenal	112	94	Aldehyde
22	5.36	0.30	Benzaldehyde	106	90	Aldehyde
23	5.47	0.22	1-heptanol	116	91	Alcohol
27	5.91	1.16	β -myrcene	136	95	Terpenoid
29	6.07	0.47	ethyl-hexanoate	144	98	Ester
30	6.16	0.22	Octanal	128	96	Aldehyde
31	6.26	0.59	α -phellandrene	136	96	Terpenoid
33	6.56	0.60	Terpinolene	136	96	Terpenoid
34	6.95	63.26	Limonene	136	94	Terpenoid
38	7.56	0.73	α -terpinene	136	97	Terpenoid
39	7.83	0.60	1-octanol	130	92	Alcohol
40	7.91	0.52	linalool oxide	170	98	Terpenoid
42	8.32	0.96	o-cimene	136	91	Terpenoid
44	8.58	0.79	Linalool	154	96	Terpenoid
45	8.66	0.47	Nonanal	142	95	Aldehyde
50	9.64	0.25	trans limonene oxide	152	92	Terpenoid
51	9.72	0.24	Isopinocarveol	152	93	Terpenoid
54	10.16	0.22	Nonenal	140	92	Aldehyde
55	10.45	0.36	Isoborneol	154	90	Terpenoid
56	10.53	0.30	ethyl benzoate	150	94	Ester
57	10.73	1.12	terpinen-4-ol	154	91	Terpenoid
59	10.96	1.13	p-cymen-8-ol	150	93	Terpenoid
60	11.11	0.78	α -terpineol	154	95	Terpenoid
61	11.24	0.76	methyl salicylate	152	96	Ester
63	11.40	0.19	Decanal	156	95	Aldehyde
65	11.64	0.23	Verbenone	150	92	Ketone
66	11.77	0.53	p-mentenal	152	95	Aldehyde
71	12.56	0.96	(-)-carvone	150	95	Terpenoid
72	12.82	0.37	Geraniol	154	95	Terpenoid
76	13.57	0.39	Vitispirane	192	95	Terpenoid
79	14.11	0.17	Theaspirane	194	92	Terpenoid
89	16.19	0.13	α -copaene	204	93	Terpenoid
90	16.40	0.18	Damascenone	190	92	Ketone
area total % identified				77.14		
area % alcohols		4.06	area % hydrocarbons		4.35	
area % aldehydes		0.53	area % ketones		4.23	
area % esters		0.76	area % terpenoids		75.38	

MW = molecular weight; S = similarity with mass spectra; % area = area % related to the total peak area

Table 3. Semivolatile compounds identified in blackberry cv. Tupy extracted with hexane

peak	RT (min)	Area %	Name	MW	S
4	3.65	3.97	aliphatic hydrocarbon		
5	3.69	1.99	aliphatic hydrocarbon		
6	3.76	1.31	aliphatic hydrocarbon		
9	3.95	0.98	aliphatic hydrocarbon		
10	4.04	5.06	aliphatic hydrocarbon		
11	4.11	1.63	C2-benzene	106	93
12	4.18	1.71	aliphatic hydrocarbon		
16	4.60	8.91	n – decane	142	93
20	4.95	2.44	aliphatic hydrocarbon		
21	5.04	2.67	C3-benzene	120	92
22	5.15	1.64	aliphatic hydrocarbon		
28	5.46	1.27	C4-benzene	134	92
32	5.87	1.50	aliphatic hydrocarbon		
36	6.15	5.05	n – undecane	156	97
52	7.57	0.66	Naphthalene	128	94
53	7.66	2.46	n – dodecane	170	95
55	7.86	0.71	aliphatic hydrocarbon		
64	9.09	1.81	n – tridecane	184	95
65	9.16	0.50	C1 naphthalene	142	91
66	9.44	0.18	C1 naphthalene	142	96
72	10.33	0.49	aliphatic hydrocarbon		
73	10.78	1.55	n – tetradecane	198	96
74	11.08	0.23	C2 naphthalene	156	95
75	11.41	0.23	C2 naphthalene	156	95
76	11.49	0.29	C2 naphthalene	156	94
78	12.17	0.87	aliphatic hydrocarbon		
80	13.24	1.81	n – pentadecane	212	98
81	14.47	0.17	C3 naphthalene	170	94
83	17.07	1.90	n – hexadecane	226	97
85	21.46	1.84	n – heptadecane	240	97
86	21.61	1.29	Pristine	268	93
88	23.73	1.29	n – octadecane	254	97
89	23.89	0.49	Phytane	282	93
91	25.34	0.91	n – nonadecane	282	95
92	26.64	0.50	n – eicosane	296	95
93	27.76	0.26	n – heneicosane	310	95

% area identified compounds

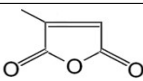
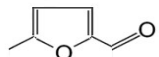
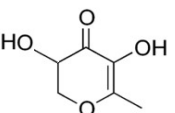
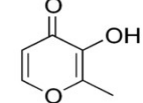
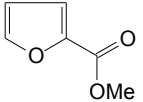
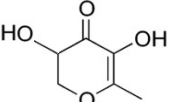
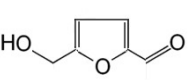
% aliphatics

% aromatics

MW = molecular weight; S = similarity with mass spectra;

% area = area % related to the total peak area

Table 4. Semivolatile compounds identified in blackberry cv. Tupy extracted with acetone

peak	RT	% area	Compound	MW	S	Structure
1	3.85	2.69	Furandione	112	91	
2	4.15	1.39	Furfural	100	93	
3	4.36	0.64	dihydro-dihydroxy-pyranone (two isomers)	144	93	
5	5.19	5.22			96	
6	5.88	2.41	Maltol	126	97	
7	5.98	0.84	methyl furoate	126	92	
8	6.93	3.62	dihydro-dihydroxy-pyranone	144	91	
9	7.60	45.50	hydroxy-furfural (two isomers)	126	98	
10	8.35	36.80			93	
18	13.77	0.67	Hexanoic acid	116	96	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
Furanos e Piranos % area identified				82.57		

MW = molecular weight; S = similarity with mass spectra; % area = area % related to the total area of identified peaks

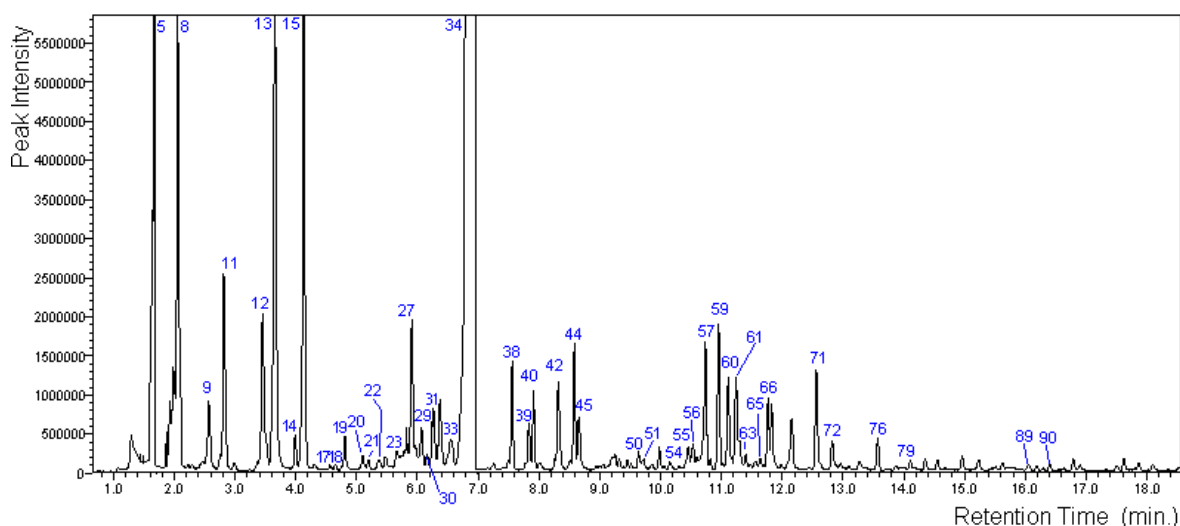


Figure 1. Total ion chromatogram of volatile compounds from blackberry cv. Tupy collected using SPME (*chromatographic conditions described in the text*)

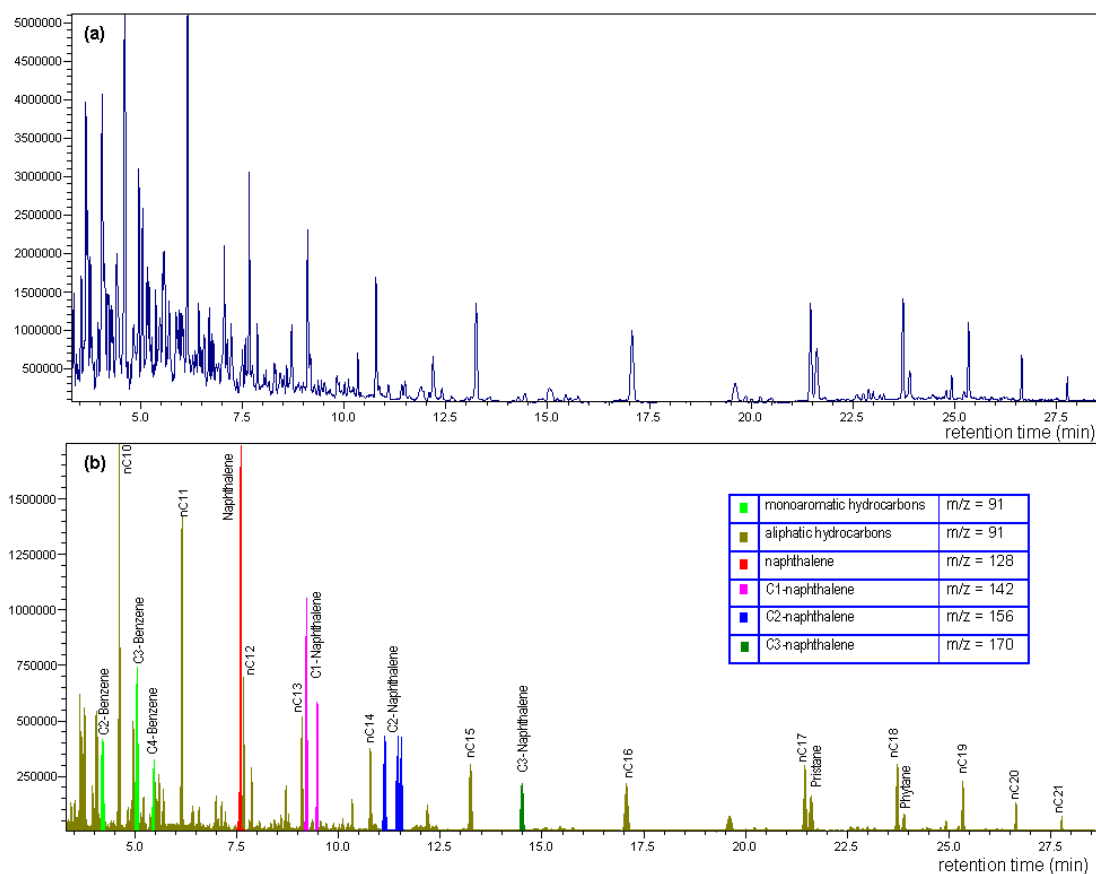


Figure 2. (a)Total ion chromatogram and (b) Monitored ion chromatogram of blackberry cv. Tupy volatiles extracted with hexane (*chromatographic conditions described in the text*)

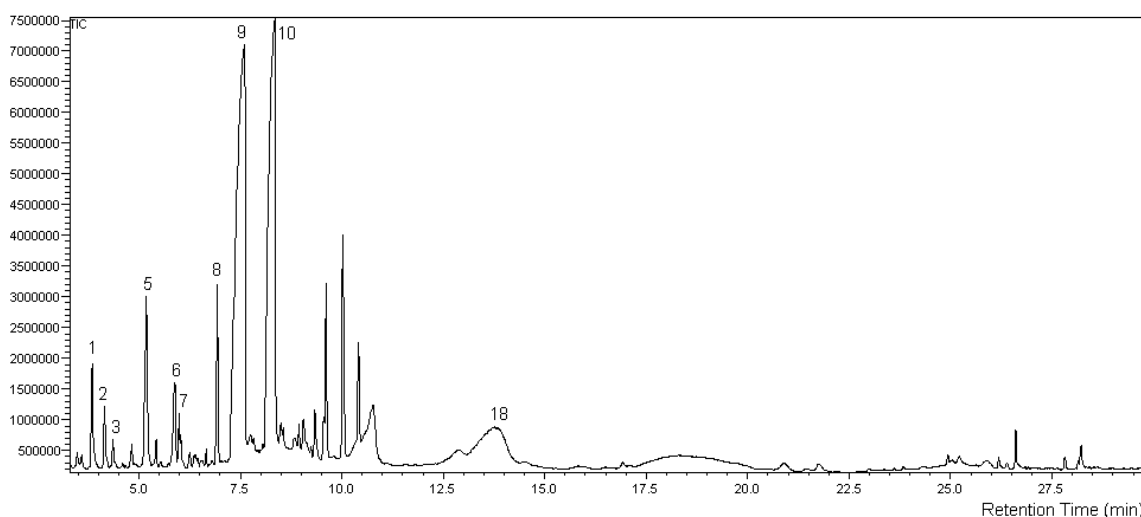


Figure 3. Total ion chromatogram of blackberry cv. Tupy volatiles extracted with acetone (*chromatographic conditions described in the text*)

References

- Antunes, L. E. C. (2002). Blackberry: A new crop option to Brazil. *Ciência Rural*, 32, 151–158.
- Archbold, D. D., Hamilton-Kemp, T. R., Barth, M. M., & Langlois, B. E. (1997). Identifying natural volatile compounds that control gray mold (*Botrytis cinerea*) during postharvest storage of strawberry, blackberry, and grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 4032–4037.
- Augusto, F., Valente, A. L. P., Tada, E. S., & Rivellino, S. R. (2000). Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 873, 117–127.
- Ayhan, Z., Yeom, H. W., Zhang, Q. H., & Min, D. B. (2001). Flavor, color, and vitamin C retention of pulsed electric field processed orange juice in different packaging materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 669–674.
- Christensen, L. P., Edelenbos, M., & Kreutzmann, S. (2007). Fruits and vegetables of moderate climate. In: *Flavours and fragrances: Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Ed. Berger, R. G. Publisher, Springer Berlin Heidelberg, pp. 135–187.
- Du, X., Finn, C. E., & Qian, M. C. (2010). Bound volatile precursors in genotypes in the pedigree of 'Marion' blackberry (*Rubus* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3694–3699.
- Du, X., Finn, C. E., & Qian, M. C. (2010b). Distribution of volatile composition in 'Marion' (*Rubus* spp. *Hyb*) blackberry pedigree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3694–3699.
- Du, X. F., Finn, C. E., & Qian, M. C. (2010c). Volatile composition and odour-activity value of thornless 'Black Diamond' and 'Marion' blackberries. *Food Chemistry*, 119(3), 1127–1134.
- Du, X. F., Kurnianta, A., McDaniel, M., Finn, C. E., & Qian, M. C. (2010d). Flavour profiling of Marion' and thornless blackberries by instrumental and sensory analysis. *Food Chemistry*, 121(4), 1080–1088.
- El-Ghorab, A., Shaaban, H. A., El-Massry, K. F., & Shibamoto, T. (2008). Chemical composition of volatile extract and biological activities of volatile and less-volatile extracts of juniper berry (*Juniperus drupacea* L.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 5021–5025.
- Finn, C. E. (2008). Blackberries. In: *Temperate fruit crop breeding: Germplasm to genomics*, Ed. Hancock, J. F., Springer Netherlands, pp. 83–114.
- Georgilopoulos, D. N., & Gallois, A. N. (1987). Aroma compounds of fresh blackberries (*Rubus laciniata* L.). *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 184(5), 374–380.

- Georgilopoulos, D. N., & Gallois, A. N. (1987b). Volatile flavor compounds in heated blackberry juices. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 185(4), 299–306.
- Georgilopoulos, D. N., & Gallois, A. N. (1988). Flavor compounds of a commercial concentrated blackberry juice. *Food Chemistry*, 28(2), 141–148.
- Hakkinen, S. H., Karenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkanen, H. M., & Torronen, A. R. (1998). HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 543–551.
- Humpf, H. U., & Schreier, P. (1991). Bound aroma compounds from the fruit and the leaves of blackberry (*Rubus laciniata* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(10), 1830–1832.
- Ibáñez, E., López-Sebastián, S., Ramos, E., Javier, T., & Reglero, G. (1998). Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, 63, 281–286.
- Jacques, A. C., Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Zambiasi, R. C., & Chim, J. F. (2010). Stability of bioactive compounds in frozen pulp of blackberry (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy. *Química Nova*, 33, 1720–1725.
- Kallio, H., & Linko, R. R. (1973). Volatile monocarbonyl compounds of arctic bramble (*Rubus arcticus*) at various stages of ripeness. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 153(1), 23–30.
- Klesk, K., & Qian, M. (2003). Aroma extract dilution analysis of cv. Marion (*Rubus* spp. *hyb*) and Cv. Evergreen (*R. laciniatus* L.) blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3436–3441.
- Klesk, K., & Qian, M. (2003b). Preliminary aroma comparison of Marion (*Rubus* spp. *hyb*) and Evergreen (*R. laciniatus* L.) blackberries by dynamic headspace/OSME technique. *Journal of Food Science*, 68(2), 697–700.
- Lewinsohn, E., Sitrit, Y., Bar, E., Azulay, Y., Ibdah, M., Meir, A., Yosef, E., Zamir, D., & Tadmor, Y. (2005). Not just colors - carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 407–415.
- Li, C., Krewer, G. W., Ji, P., Scherm, H., & Kays, S. J. (2010). Gas sensor array for blueberry fruit disease detection and classification. *Postharvest Biology and Technology*, 55(3), 144–149.
- Machado, C. C. B., Bastos, D. H. M., Janzantti, N. S., Facanali, R., Marques, O. M., & Franco, M. R. B. (2007). Volatile compounds profile and flavor analysis of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) beverages. *Química Nova*, 30, 513–518.
- Malowicki, S. M. M., Martin, R., & Qian, M. C. (2008). Comparison of sugar, acids, and volatile composition in raspberry bushy dwarf virus-resistant transgenic

raspberries and the wild type 'Meeker' (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6648–6655.

Malowicki, S. M. M., Martin, R., & Qian, M. C. (2008b). Volatile composition in raspberry cultivars grown in the pacific northwest determined by stir bar sorptive extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4128–4133.

Meret, M., Brat, P., Mertz, C., Lebrun, M., & Gunata, Z. (2011). Contribution to aroma potential of Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.). *Food Research International*, 44(1), 54–60.

Mertz, C., Cheynier, V., Gunata, Z., & Brat, P. (2007). Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8616–8624.

Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., & Diamantidis, Gr. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102, 777–783.

Pino, J., Marbot, R., & Vazquez, C. (2005). Volatile constituents of genipap (*Genipa americana* L.) fruit from Cuba. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(6), 583–586.

Pyysalo, T. (1976). Identification of volatile compounds in hybrids between raspberry (*Rubus idaeus*, L.) and arctic bramble (*Rubus arcticus*, L.). *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 162(3), 263–272.

Qian, M. C., & Wang, Y. (2005). Seasonal variation of volatile composition and odor activity value of 'Marion' (*Rubus* spp. *hyb*) and 'Thornless Evergreen' (*R. laciniatus* L.) blackberries. *Journal of Food Science*, 70, 13–20.

Riu-Aumatell, M., Castellari, M., López-Tamames, E., Galassi, S., & Buxaderas, S. (2004). Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. *Food Chemistry*, 87, 627–637.

Rodrigues-Amaya, D. B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. Washington:ILST Press, USA. 64p.

Sanz, C., Olías, J. M., & Perez, A. G. (1997). Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In: *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*; Tomas-Barberán, F. A., Robins, R. J., Eds.; Clarendon Press: Oxford, U.K., pp. 125–155.

Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9329–9339.

Siriworn, T., & Wrolstad, R. E. (2004) Polyphenolic composition of Marion and Evergreen blackberries. *Journal of Food Science*, 69, 233–240.

Stevens, M. A., Kader, A. A., & Albright, M. (1979). Potential for increasing tomato flavor via increased sugar and acid content. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 104, 40–42.

Tieman, D. M., Zeigler, M., Schmelz, E. A., Taylor, M. G., Bliss, P., Kirst, M., & Klee, H. J. (2006). Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany*, 57, 887–896.

Turemis, N., Kafkas, E., Kafkas, S., Kurkcuoglu, M., & Baser, K. H. C. (2003). Determination of aroma compounds in blackberry by GC/MS analysis. *Chemistry of Natural Compounds*, 39, 174–176.

Vazquez-Araujo, L., Chambers, E. IV, Adhikari, K., & Carbonell-Barrachina, A. A. (2010). Sensory and physicochemical characterization of juices made with pomegranate and blueberries, blackberries, or raspberries. *Journal of Food Science*, 75(7), S398–S404.

Wang, Y., Finn, C., & Qian, M. C. (2005). Impact of growing environment on Chickasaw blackberry (*Rubus* L.) aroma evaluated by gas chromatography olfactometry dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3563–3571.

6. CAPITULO III. Efeito da sanitização à base de cloro sobre microrganismos contaminantes e compostos bioativos na polpa de amora-preta (*Rubus fruticosus*)

JACQUES, A.C.^{1*}; ZAMBIAZI, R.C.²; GANDRA, E. A.²; CHAVES, F.C.; MACHADO, M. R, G..²; KRUMREICH, F.D.³; LUZ, .S.R.³

Doutoranda do Depto Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas. e-mail. andressa.jacques@yahoo.com.br

² Professor, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas.

³ Graduando de química de alimentos. Universidade Federal de Pelotas.

* Autor para correspondência

Resumo

A amoreira-preta é uma espécie arbustiva que produz frutos denominados de mini drupas com sementes formando frutos agregados. É uma fruta com alto teor de compostos bioativos, contribuindo para a prevenção de algumas doenças. Devido sua estrutura, esta fruta pode ser potencial veiculadora de microrganismos se consumida ou processada sem correta sanitização. Em face do exposto o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da sanitização com hipoclorito de sódio e verificar a influência deste processo sobre a estabilidade dos compostos bioativos na após a obtenção da polpa de amora-preta cv. Tupy. Para o controle microbiológico de fungos, a única concentração eficiente foi pela imersão em soluções com 200ppm de hipoclorito de sódio pelo período de 15 minutos; porém nesta concentração as perdas observadas para compostos fenólicos individuais, antocianinas, tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides individuais foram respectivamente de 56, 32, 37, 54 e 18%. A concentração mais adequada da solução para evitar perdas dos compostos bioativos presentes na amora preta foi de 50 ppm de hipoclorito de sódio pelo período de 5 e 15 min. de imersão.

Palavras-chave: Sanitização, contaminantes, amora-preta, bioativos

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de frutas *in natura*, porém, por serem perecíveis, grande parte dessas frutas se deterioram em poucos dias, tendo sua comercialização dificultada, especialmente quando ocorre a longas distâncias do local da produção. O processamento de polpas de frutas tem se destacado como uma importante alternativa para o aproveitamento dos frutos durante a safra, permitindo a estocagem e comercialização fora da época de produção dos frutos *in natura* (BRUNINI; DURIGAN; OLIVEIRA, 2002). Segundo a legislação brasileira do Ministério da Agricultura, polpa é o produto não fermentado, não concentrado ou diluído, obtido pelo esmagamento de frutos polposos (BRASIL, 2000).

A amora-preta (*blackberry*) pertence ao gênero *Rubus* que contém, aproximadamente, 740 espécies que são divididas segundo alguns autores, em 12 a 15 subgêneros (JENNINGS, 1988, *apud* DAUBENY, 1996). Devido à alta taxa respiratória e rápida degradação, a produção de polpa torna-se uma alternativa de conservação. As frutas, principalmente as que apresentam a coloração vermelha ou azul, como a amora-preta, são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares. Estas cores são características das antocianinas, que são compostos fenólicos pertencentes à classe dos flavonóides. Muitos destes compostos apresentam uma gama de efeitos biológicos, incluindo ação antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória e vasodilatadora (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004).

As frutas e hortaliças são potenciais veiculadores de microrganismos que podem estar associados à toxinfecções alimentares e, conseqüentemente, a doenças transmitidas por alimentos (DTA). De acordo com Banwart (1989), sanitizantes contendo compostos de cloro, incluindo hipoclorito de sódio e de cálcio, são amplamente utilizados na indústria de processamento de alimentos. O cloro, especialmente na forma de sal de hipoclorito, é empregado para o controle bacteriológico de frutas e hortaliças, porém alguns fatores como concentração de cloro ativo da solução e o tempo de ação do sanitizante são determinantes para a eficácia do efeito antimicrobiano conferido ao produto (Banwart, 1989; Andrade e Martyn, 1996).

Em face do exposto, o objetivo deste trabalho foi de avaliar a eficiência da sanitização com hipoclorito de sódio e verificar a influência deste processo sobre a

estabilidade dos compostos bioativos na após a obtenção da polpa de amora-preta cv. Tupy.

2. MATERIAL E METODOS

As frutas de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy foram colhidas em novembro de 2010 na cidade de Morro Redondo, apresentando na data da colheita 11.2° Brix e acidez titulável de 0,97% em ácido málico. Ao serem recebidas no laboratório, as frutas foram selecionadas de acordo com o grau de sanidade visual (presença de podridão), e imersas nas soluções de água clorada preparadas a partir de hipoclorito de sódio à 10% (m/v). As concentrações utilizadas foram: 0, 50, 100, 150 e 200ppm de hipoclorito de sódio. Um lote dos frutos, relativos aos diferentes tratamentos, permaneceram por 5 minutos em imersão, e outro lote foi submetido por 15 minutos. Após a imersão deixou-se escorrer os frutos por 2 min.

A polpa foi obtida pela trituração da fruta em liquidificador, sem que houvesse a separação das sementes. Após a polpa foi acondicionada em embalagens de polietileno de alta densidade (0,45 micra). Objetivando-se evitar a contaminação cruzada, todos equipamentos e utensílios utilizados no processamento foram higienizados pela imersão em solução de NaOCl à 200ppm (200 mg.L⁻¹)

2.1 Determinações Microbiológicas

As amostras foram analisadas microbiologicamente (em triplicata) mediante a quantificação de coliformes totais e termotolerantes, pesquisa de *Salmonella* spp e quantificação de Fungos, de acordo com os procedimentos propostos por DOWNES e ITO (2001) e SILVA *et al.* (2007).

Para as determinações microbiológicas, foram pesadas 25 g de cada amostra e transferidas assepticamente para frascos contendo 225 mL de água peptonada estéril (diluição 10⁻¹). A partir dessa diluição, foram feitas as diluições seriadas até 10⁻⁴ com o mesmo diluente.

Para a enumeração de coliformes totais e termotolerantes utilizou-se a técnica do Número Mais Provável (NMP). A análise presuntiva de coliformes foi realizada em Caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST), com incubação por 48 horas a 35°C. A enumeração de coliformes totais foi efetuada em Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante, com incubação a 35°C por 24 a 48 horas. A enumeração de coliformes termotolerantes foi realizada em Caldo *Escherichia coli* (EC) com incubação a 45,5°C por 24 horas.

Para contagem de Fungos, foi utilizado o método de plaqueamento direto em superfície em meio Ágar Batata Dextrose (BDA). Após a inoculação as placas foram incubadas a 25°C e foram realizadas contagens após cinco dias.

A Pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada utilizando 25g das amostras, as quais foram submetidas à um pré-enriquecimento em Água Peptonada Tamponada - APT com incubação por 24 horas a 37°C, seguida de um enriquecimento seletivo em Caldo Tetracionato - TT e Caldo Rappaport-Vassiliadis - RV por 24 horas a 35°C e 42°C, respectivamente. Após, foi realizado um plaqueamento diferencial nos Ágares Hektoen Enterico - HE e Xylose Lisina Desoxicolato - XLD por 24 horas a 37°C, a fim de obter colônias isoladas típicas de *Salmonella* spp.

As colônias suspeitas, seriam então, submetidas a uma confirmação bioquímica, através dos meios, Ágar Tríplice Açúcar Ferro - TSI, Ágar Lisina Ferro - LIA e Ágar Uréia - UA. As cepas que apresentassem reações bioquímicas características para *Salmonella* spp. em pelo menos dois dos três testes realizados seriam submetidas a teste sorológico de aglutinação rápida, utilizando-se Soro Polivalente Anti-Salmonella Somático e Soro Polivalente Anti-Salmonella Flagelar.

Os isolados foram confirmados como *Salmonella* spp. quando apresentaram bioquimismo característico e reação sorológica positiva, pelo menos, frente ao Soro Polivalente Anti-Salmonella Somático.

2.2 Determinação de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram extraídos da polpa das frutas usando o método descrito por Häkkinen, Karenlampi e Heinonen (1998). Foi retirado uma alíquota de 30µL do extrato obtido para injetar no cromatógrafo.

O cromatógrafo consistiu no sistema HPLC-Shimadzu, com injetor automático, detector UV-visível a 280nm, coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS

(5 μ m, 4,6mm x 150mm) com fase estacionária octadecil e uma coluna de guarda CLC-GODS com fase estacionária de superfície octadecil, ambas localizadas em forno a 25°C. A fase móvel consistiu no gradiente de eluição utilizando solução aquosa de ácido acético (99:1, v/v) e metanol, com fluxo de 0,8mL/ min, com um tempo total de corrida de 45 minutos, segundo metodologia descrita por Zambiasi (1997).

2.3 Determinação do conteúdo de antocianinas

A determinação de antocianinas foi feita utilizando-se etanol acidificado, seguindo método original (Lees e Francis, 1972). O cálculo do conteúdo de antocianinas foi baseado na Lei de Beer e os resultados foram expressos em mg de cianidina 3-glicosídeo.100 g⁻¹ de amostra.

2.4 Determinação de tocoferóis

A extração de tocoferóis foi realizada segundo a metodologia descrita para a extração de carotenóides (Rodriguez-Amaya, 1999). Foram injetados 20 μ L do extrato obtido no cromatógrafo líquido que consistiu no sistema HPLC-Shimadzu (idem ao descrito para a análise de compostos fenólicos), equipado com detector de fluorescência, utilizando o comprimento de onda de 290nm para excitação e de 330nm para a emissão. A separação foi efetuada utilizando um sistema de eluição por gradiente, utilizando como fases móveis o metanol, acetonitrila e isopropanol, seguindo a metodologia descrita por Zambiasi (1997).

2.5 Determinação de ácido ascórbico

A extração de ácido L-ascórbico foi feita de acordo com a metodologia descrita por Yeom, Zhang and Min (2001).

A análise de cromatografia líquida de alta eficiência consistiu no sistema HPLC-Shimadzu (idem ao descrito na análise de compostos fenólicos), utilizando o detector UV-visível a 254 nm. A separação foi desenvolvida utilizando um sistema de gradiente com as fases móveis contendo água ultra pura:ácido acético (99,9:0,1 v/v) e metanol, com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, Yeom, Zhang and Min (2001).

2.6 Determinação do conteúdo de carotenoides

O processo de extração dos carotenóides foi realizado utilizando a metodologia descrita por Rodriguez- Amaya (1999). Após a etapa de extração foi realizada a saponificação da amostra, adicionando 25mL de solução alcoólica de KOH 1,5N em 25mL de extrato de amostra, deixando em repouso na ausência de luz por 18 h. Após este período foi adicionado éter etílico, ocorrendo a separação das fases. A alíquota orgânica foi concentrada em rotaevaporador à 35 °C e dissolvida em metanol: acetonitrila, 30:70 v/v. O extrato foi transferido para tubos de eppendorf e centrifugado nas condições de 9000 rpm por 6 minutos. O sobrenadante (25µL) foi injetado no cromatógrafo líquido de alta eficiência.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência consistiu no sistema HPLC-Shimadzu (idem ao descrito para a análise de compostos fenólicos), equipado com detector UV, utilizando o comprimento de onda de 450nm.

A separação foi efetuada utilizando um sistema de eluição por gradiente de metanol, acetonitrila e acetato de etila, com um fluxo de 1mL/min, seguindo metodologia descrita por Rodriguez- Amaya (1999).

2.7 Análise Estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA), e pelo teste de Tukey, ambos ao nível de 5% de significância, utilizando-se o Programa Statistic 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resolução RDC nº 12 de 02/01/2001, que discrimina os padrões microbiológicos para alimentos em geral, estabelece valor máximo de 10^2 UFC.g⁻¹ para coliformes termotolerantes, porém não estabelece padrões para bolores e leveduras.

De acordo a Instrução normativa nº 1 de 07 de janeiro de 2000, a polpa de fruta deverá observar os limites: Soma de bolores e leveduras: máximo $5 \times 10^3/\text{g}$ para polpa "in-natura", congelada ou não, coliformes termotolerantes: máximo 1 NMP/ g; salmonella: ausente em 25 g.

Tabela 1. Resultados das análises microbiológicas para fungos, coliformes totais e termotolerantes e *Salmonella* spp.

Polpas Tratamento/ Tempo	Fungos (UFC.g ⁻¹)	Coliformes totais (NMP.g ⁻¹)	Coliformes termotolerantes (NMP.g ⁻¹)	Pesquisa de <i>Salmonella</i> ausência/ presença
Sem tratamento	$3,75 \times 10^6$	<0,3	<0,3	Ausência
50ppm/5min	$2,26 \times 10^6$	4	4	Ausência
50ppm/15min	$1,3 \times 10^6$	<0,3	<0,3	Ausência
100ppm/5min	$9,75 \times 10^5$	<0,3	<0,3	Ausência
100ppm/15min	$7,45 \times 10^5$	<0,3	<0,3	Ausência
150ppm/5min	$3,5 \times 10^4$	<0,3	<0,3	Ausência
150ppm/15min	$2,2 \times 10^4$	<0,3	<0,3	Ausência
200ppm/5min	$6,5 \times 10^3$	<0,3	<0,3	Ausência
200ppm/15min	4×10^3	<0,3	<0,3	Ausência
Padrão Federal	$5 \times 10^3^*$	1 [*]	10 ^{2**}	Ausência em 25g

* Instrução Normativa nº1 de 07 jan de 2000/MAPA (Brasil, 2000)

**RDC nº 12, de 02/01/2001/MS (Brasil, 2001).

De acordo com a Tabela 1, observa-se que a sanitização das frutas com soluções de concentrações de 50 à 150ppm de hipoclorito de sódio, submetidas por 5 e 15 minutos, não foram eficientes para reduzir a contagem de fungos de acordo com o anexo I do Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta da Instrução normativa nº 1 de 07 de janeiro de 2000 (Brasil, 2000). A sanitização dos frutos em soluções à 200ppm de hipoclorito de sódio por 5 minutos também não foi eficiente; apenas os frutos imersos por 15 minutos na solução clorada de 200ppm demonstrou-se eficiente.

Antoniolli (2005), em acordo com os resultados deste estudo, também relata como melhores resultados de sanitização com NaOCl, na concentração de 200mg.L⁻¹, por 10 minutos, quando sanitizou abacaxis.

A presença de fungos verificada nas amostras não parece ser um fato restrito, Nascimento et al. (1999), ao estabelecerem o perfil microbiológico de polpas produzidas e comercializadas na cidade de São Luís – MA, constataram que 100% das amostras apresentaram contaminação por fungos, apresentando contagens

entre $1,0 \times 10^5$ e $1,1 \times 10^8$ UFC.g⁻¹. Segundo Franco e Landgraf (2003), baixas contagens de bolores e leveduras ($>5 \times 10^3$ UFC.g⁻¹) são consideradas normais em alimentos frescos e congelados, no entanto, contagens elevadas representam, além do aspecto deteriorante, que pode levar inclusive à rejeição do produto, um risco à saúde pública devido à possível produção de micotoxinas por algumas espécies de bolores.

A Legislação Brasileira, ANVISA - Resolução RDC-12/MS (Brasil, 2002), estabelece o limite de 5×10^2 UFC de coliformes termotolerantes por grama, para frutas, produtos de frutas e similares - frescas, *in natura*, preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas), sanitizadas, refrigeradas ou congeladas para consumo direto.

Neste estudo observou-se a presença de coliformes totais e termotolerantes (Tabela 1), com a polpa sanitizada por 5 min na concentração de 50ppm. A baixa concentração destes microrganismos nas amostras, possivelmente pode ser explicado pelo baixo valor de pH apresentado na maioria das polpas, isto pode representar um fator limitante para o crescimento de bactérias, principalmente de patogênicas, mantendo os índices de contaminação bacteriana em níveis baixos.

De acordo com Oliveira (2006), a elevada acidez em sucos de laranja (pH de 3,1 à 4,0) oferece um ambiente inóspito e seletivo para um grande número de patógenos, porém neste estudo os autores encontram a presença de coliformes termotolerantes, podendo ser uma contaminação devido as más condições sanitárias da indústria local de processamento já que o suco de laranja apresentou um baixo pH assim como a amora-preta cv Tupy (3,23). No entanto, estudos realizados por Santos (2008) não detectaram a presença de coliformes termotolerantes em polpas de açaí, acerola, maracujá e cupuaçu, concluindo que o baixo valor de pH apresentado pela maioria das polpas pode representar um fator limitante para o crescimento de bactérias patogênicas, mantendo os índices de contaminação bacteriana em níveis baixos.

O controle da concentração microbiana são as práticas higiênicas que devem ser observadas no preparo e processamento das polpas. A contaminação por coliformes totais e termotolerantes em polpa de maracujá também foi verificada por Leite et al. (2000) e Lima et al. (2001), estando, provavelmente, associada à manipulação inadequada durante o processamento da matéria-prima, ou à contaminação de equipamentos. Já com relação à *Salmonella* spp., não foi

observada em amostra alguma a presença deste microrganismo. Este fato pode ser possivelmente explicado pela baixa competitividade deste microrganismo, pela elevada sensibilidade a valores de pH ácido e a ação de compostos a base de cloro ativo.

Tabela 2: Conteúdo de compostos fenólicos e de antocianinas na polpa de amora-preta cv. Tupy, submetidas em soluções sanitizantes a base de cloro

Polpas Tratamento/ Tempo	Compostos Fenólicos Individuais (mg.100g ⁻¹)					Total	Antocianinas Totais (mg.100g ⁻¹)
	Ácido Gálico	Ácido Hidroxi- Benzóico	Catequina	Epicate- quina	Querce- Tina		
Sem tratamento	278,84 ^A	237,95 ^A	10,21 ^A	160,79 ^A	22,20 ^A	709,98 ^A	110,73 ^A
50ppm/5min	264,50 ^A	222,50 ^A	10,25 ^A	155,00 ^A	20,50 ^A	672,75 ^A	109,90 ^A
50ppm/15min	220,11 ^B	190,54 ^A	10,19 ^A	154,23 ^A	19,14 ^A	589,92 ^B	107,80 ^A
100ppm/5min	202,80 ^C	167,49 ^A	10,10 ^A	155,48 ^A	20,02 ^A	555,89 ^B	111,90 ^A
100ppm/15min	168,75 ^D	94,99 ^B	8,68 ^A	138,25 ^A	14,88 ^A	425,55 ^B	110,76 ^A
150ppm/5min	167,88 ^D	89,99 ^B	7,99 ^A	135,23 ^A	15,01 ^B	416,10 ^B	100,09 ^A
150ppm/15min	158,80 ^D	88,88 ^B	5,67 ^B	126,88 ^A	12,09 ^B	392,32 ^C	90,88 ^B
200ppm/5min	145,78 ^D	70,90 ^B	3,61 ^B	85,01 ^B	12,65 ^B	317,95 ^C	77,09 ^B
200ppm/15min	134,99 ^E	71,09 ^B	3,09 ^B	84,98 ^B	13,04 ^B	307,19 ^C	75,06 ^B

Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância entre os tratamentos.

Por ser um agente oxidante, o cloro livre pode reagir com compostos orgânicos sintéticos e naturais, participando de reações de oxidação e substituição, em que moléculas de cloro são adicionadas às moléculas denominadas precursoras. As reações que envolvem o cloro residual livre e os compostos orgânicos naturais (CONs) são extremamente complexas, uma vez que os compostos orgânicos apresentam uma elevada diversidade de grupos funcionais aromáticos, carboxílicos, fenólicos, bem como uma diversidade de duplas e triplas ligações que são passíveis de serem atacadas pelo agente oxidante (FILHO e SAKAGUTI, 2008).

É muito difícil a previsão do comportamento cinético do cloro em meio aquoso, bem como a previsão da formação de subprodutos da desinfecção sem que sejam conduzidos ensaios experimentais específicos, porém pode-se observar que o tratamento de sanitização ocasionou uma redução do conteúdo de vários compostos fenólicos e no conteúdo total de antocianinas (Tabela 2).

O conteúdo de antocianinas reduziu em torno de 32% após a aplicação com a solução clorada mais concentrada (200ppm) e em maior tempo de exposição (15 minutos), sendo que esta foi a única solução eficiente na sanitização contra bolores

e leveduras nas amostras, conforme observado na Tabela 1. A soma do conteúdo de compostos fenólicos na amostra que não foi submetida a tratamento quando comparada com amostra submetida em solução com 200 ppm de hipoclorito, por 15 minutos, apresentou uma redução de 56%, sendo o ácido hidroxibenzóico e catequina os mais afetados, reduzindo de seu teor inicial em cerca de 70%.

Tabela 3: Conteúdo de Tocoferóis e de Ácido ascórbico na polpa de amora-preta cv. Tupy, submetida em soluções a base de cloro

Polpas Tratamento/ Tempo	Tocoferóis (mg.100g ⁻¹)				Ácido ascórbico (mg.100g ⁻¹)
	δ –Tocoferol	(β+γ)- Tocoferol	α-Tocoferol	Total (α+β+γ+δ)	
Sem tratamento	0,499 ^A	0,249 ^A	0,125 ^A	0,873 ^A	1,08 ^A
50ppm/5min	0,488 ^A	0,244 ^A	0,120 ^A	0,852 ^A	0,992 ^A
50ppm/15min	0,489 ^A	0,240 ^A	0,121 ^A	0,859 ^A	0,972 ^A
100ppm/5min	0,400 ^B	0,200 ^B	0,108 ^B	0,708 ^B	0,761 ^B
100ppm/15min	0,401 ^B	0,198 ^B	0,104 ^B	0,703 ^B	0,781 ^B
150ppm/5min	0,350 ^C	0,133 ^C	0,108 ^B	0,591 ^C	0,588 ^C
150ppm/15min	0,351 ^C	0,129 ^C	0,110 ^B	0,590 ^C	0,577 ^C
200ppm/5min	0,340 ^C	0,120 ^C	0,098 ^B	0,558 ^C	0,499 ^C
200ppm/15min	0,338 ^C	0,119 ^C	0,089 ^B	0,546 ^C	0,496 ^C

Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância entre os tratamentos.

A vitamina E é encontrada principalmente em produtos que apresentam alto teor em gordura, como amêndoas, óleos vegetais e algumas frutas e vegetais (LINS, 2006). A amora-preta apresentou uma quantidade reduzida de tocoferóis (tab. 3), o que pode ser explicado pela baixa quantidade de gordura presente neste fruto.

Chun et al. (2006) encontraram para a amora-preta 3,74mg.100g⁻¹ de tocoferóis, resultados bem superiores ao encontrado neste estudo (0,873mg.100g⁻¹), porém, ressalta-se que estes autores quantificaram separadamente o δ, β, γ e α-tocoferol, e no presente estudo quantificou-se conjuntamente o β+γ tocoferóis, que pode ser, pelo menos parcialmente, um dos motivos desta diferença, além das diferenças entre cultivares, espécies, clima, entre outros.

Pode-se observar que ocorreram diferenças significativas no conteúdo de tocoferóis entre as amostras submetidas nas diferentes soluções com concentrações de cloro a partir da concentração de 100ppm, demonstrando uma redução de até

35% quando submetida na solução com concentração de 200ppm, em relação ao teor inicial de vitamina E.

A polpa de amora-preta submetida a sanitização com solução de hipoclorito à 50ppm por 5 e 15 minutos de imersão, manteve seu conteúdo de tocoferóis e de ácido ascórbico praticamente inalterado, não apresentando diferenças significativas.

Vários trabalhos já avaliaram o efeito da aplicação de soluções a base de cloro sobre o ácido ascórbico durante o processamento de frutas e hortaliças. No entanto, não foram encontrados dados sobre a estabilidade desta vitamina frente a sanitização de amora-preta para posterior processamento em forma de polpa.

De acordo com Ozkan et al. (2004), devido à sua instabilidade, o ácido ascórbico tem sido utilizado como indicador da qualidade nutricional de frutas e hortaliças. Neste estudo, observaram-se altas perdas na sanitização com a solução de maior concentração (200ppm) e tempo de exposição (15 minutos), atingindo cerca de 55% de redução em relação ao conteúdo inicial.

Pode-se observar também que entre os tempos de imersão nas diferentes concentrações das soluções cloro, não houveram diferenças significativas, podendo concluir então que apenas a solução de concentração a partir de 100ppm exerceu influência no conteúdo de ácido ascórbico.

Tabela 4: Conteúdo de carotenóides na polpa de amora-preta cv. Tupy, submetida em soluções sanitizantes a base de cloro

Polpas Tratamento/ Tempo	Carotenóides (mg.100g ⁻¹)				
	β- Criptoxantina	Luteína + Zeaxantina	β-caroteno	Licopeno	Total
Sem tratamento	0,250 ^A	0,490 ^A	0,007 ^A	0,014 ^A	0,761 ^A

50ppm/5min	0,249 ^A	0,487 ^A	0,007 ^A	0,010 ^B	0,754 ^A
50ppm/15min	0,251 ^A	0,488 ^A	0,007 ^A	0,011 ^B	0,757 ^A
100ppm/5min	0,240 ^A	0,479 ^A	0,006 ^A	0,009 ^B	0,734 ^A
100ppm/15min	0,241 ^A	0,475 ^A	0,007 ^A	0,010 ^B	0,733 ^A
150ppm/5min	0,235 ^B	0,420 ^B	0,005 ^A	0,006 ^c	0,666 ^B
150ppm/15min	0,221 ^B	0,395 ^B	0,005 ^A	0,007 ^c	0,628 ^B
200ppm/5min	0,218 ^B	0,399 ^B	0,005 ^A	0,006 ^c	0,628 ^B
200ppm/15min	0,215 ^B	0,394 ^B	0,005 ^A	0,007 ^c	0,621 ^B

Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância entre os tratamentos.

Quando comparado com os outros compostos bioativos avaliados, pode-se observar que as perdas de carotenóides foram menores, representando apenas 18% (Tabela 3); segundo Jacques et al. (2009), estes pigmentos além de serem encontrados em pequena quantidade na amora-preta, apresentam-se protegidos por outros compostos presentes no meio, os quais atuariam como antioxidantes dos próprios carotenóides.

O conteúdo de carotenóides não foi afetado nas amostras submetidas em soluções sanitizantes com concentrações de até 100ppm e tempo de imersão de 15 minutos, não ocorrendo diferenças significativas ao nível de 5% de significância entre os diferentes tratamentos.

Costa et al. (2003) encontraram na polpa de acerola uma maior instabilidade de β -criptoxantina em relação ao β -caroteno, o que também, foi observado neste estudo com a amora-preta. Neste estudo observou-se que as perdas de β -caroteno permaneceram praticamente estáveis nas amostras submetidas nas soluções com as diferentes concentrações utilizadas; diferentemente do comportamento observado com a β -criptoxantina, o que demonstra que nas condições deste estudo o β -caroteno foi menos afetado pela concentração de cloro do que os demais carotenóides.

O teor de luteína mais zeaxantina encontrados na amora-preta (0,490 mg.100g⁻¹) logo após processada na forma de polpa, são superiores ao encontrado por Rosso e Mercadante (2005) para acerola (0,100mg.100g⁻¹), porém estes autores quantificaram a luteína isoladamente.

Com relação ao teor de licopeno, pode-se observar que houveram diferenças significativas com o conteúdo de todas as amostras submetidas nas diferentes concentrações de cloro e nos diferentes tempos de imersão. O licopeno é composto por onze ligações conjugadas e duas ligações duplas não conjugadas, e por isso, é

considerado como o carotenóide que possui uma das maiores capacidades seqüestrantes do oxigênio singlete (SHAMI; MOREIRA, 2004), podendo esta ser uma das causas da maior influência dos tratamentos utilizados com o cloro, já que este é um potente agente oxidante.

4 CONCLUSÃO

Para o controle microbiológico de fungos, a única concentração eficiente foi pela imersão em soluções com 200ppm de hipoclorito de sódio pelo período de 15 minutos; porém nesta concentração as perdas observadas para compostos fenólicos individuais, antocianinas, tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides individuais foram respectivamente de 56, 32, 37, 54 e 18%.

A concentração mais adequada da solução para evitar perdas dos compostos bioativos presentes na amora preta foi de 50 ppm de hipoclorito de sódio pelo período de 5 e 15 min. de imersão.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N. J.; MARTYN, M. E. L. Limpeza e sanitização na indústria de alimentos: Viçosa, Universidade Federal de Viçosa,. 1996. 39p. no. 142
- ANTONIOLLI, L. R.; BENEDETI, B. C.; FILHO, M. M. S.; BORGES, M. F. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi 'pérola' minimamente processado. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 27, n. 1, p. 157-160, Abril 2005
- BANWART, G. J. Basic food microbiology. 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. 774p.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA DO ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 01/00, de 07/01/00. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2000, Seção I, p.54-58.
- BRUNINI, M. A.; DURIGAN, J. F.; De OLIVEIRA, A. L. Avaliação das alterações em polpa de manga "Tommy-Atkins" congeladas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 651-653, 2002
- DAUBENY, H.A. Brambles. **Fruit Breeding**. New York: John Wiley & Sons, 1996. p.109-190.

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

DOWNES, F. P.; ITO, H. (ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 676 p

FILHO, S.S.F.; SAKAGUTTI, M.I comportamento cinético do cloro livre em meio aquoso e formação de subprodutos da desinfecção Eng. sanit. ambient. Vol.13 - Nº 2 - abr/jun 2008, 198-206

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003

JACQUES, A. C., PERTUZATTI, P. B., BARCIA, M. T., ZAMBIAZI, R. C., CHIM, J. F. (2010). Stability of bioactive compounds in frozen pulp of blackberry (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy. *Química Nova*, 33, 1720–1725

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

LEITE, C. C. et al. Avaliação Microbiológica de polpas congeladas de frutas produzidas no Estado da Bahia. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 78-79, p. 69-73, 2000.

LIMA, J. R.; MARTINS, S. C. S.; SILVA, J. L. A. Avaliação de popas de frutas congeladas comercializadas no estado do Ceará através de indicadores microbiológicos. **Higiene Alimentar**, v.15, n.88, p. 62-66, 2001

NASCIMENTO, A. R. et al. Perfil microbiológico de polpas de acerola (*Malpighia glabal*) e abacaxi (*Ananas comosus*), produzidas e comercializadas na ilha de São Luís, MA. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 62, p. 44-47, 1999.

FILHO, SIDNEY SECKLER FERREIRA; SAKAGUTI, MARIANE Eng. sanit. ambient.; V.13 - Nº 2 - abr/jun 2008, 198-206

OLIVEIRA, J.C.; SETTI-PERDIGÃO, P.; SIQUEIRA, K.A.G.; SANTOS, A.C.; MIGUEL, A.L. Características microbiológicas do suco de laranja *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.241-245, 2006.

OZKAN, M.; KIRCA, A.; CEMEROGLU, B. Effects of hydrogen peroxidase on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices. **Food Chemistry**, v. 88, n. 4, p. 591-597, dec. 2004.

SANTOS, C.A.A.; COELHO, A.F.S.; CARREIRO, S.C. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, n.4, p. 913-915, 2008

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 296p

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista Nutrição**, v.17, n.2, p.227-236, 2004

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A amora-preta cv. Tupy é uma excelente fonte de compostos com atividade antioxidante, dentre eles destacam-se os compostos fenólicos e as antocianinas, sendo que esta fruta possui grandes possibilidade de atingir o mercado de frutas frescas.

A amora-preta possui quantidade significativa de compostos voláteis realçando seu aroma e tornado-a uma fruta atrativa, sendo que a técnica mais

eficiente para isolamento destes compostos é a microextração em fase sólida (SPME) utilizando headspace.

A etapa de processamento desta fruta requer sanitização para diminuição da carga microbiana. O sanitizante mais empregado na indústria ainda é o cloro, porém devido ao alto potencial oxidante deste composto ele causa alteração na composição fitoquímica desta cultura.

A única concentração que foi eficiente para manter de acordo com a legislação os níveis de fungos foi 200ppm de cloro com as frutas imersas por 15 minutos, sendo que nesta concentração as perdas observadas para compostos fenólicos individuais, antocianinas, tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides individuais foram respectivamente: 56, 32, 37, 54 e 18%.