

JOSIANE FREITAS CHIM

Química de Alimentos

M.Sc. em Ciências

Caracterização de compostos bioativos em amora-preta
(*Rubus sp.*) e sua estabilidade no processo e
armazenamento de geléias convencional e *light*

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).

Comissão de orientação:

Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi (Orientador) – DCA/ UFPEL

Prof.^a Dr.^a Rosane da Silva Rodrigues (Co-orientadora) – DCA/ UFPEL

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Paulo Renato Buchweitz - DCA/ UFPEL

Dr.^a Márcia Vizzotto – EMBRAPA - CPACT

Dr. Valdecir Carlos Ferri - UFPEL

“Aprender é o único exercício de que a mente não se cansa, não teme e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, força e proteção.

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

Aos Professores e funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos pelo apoio, auxílio e compreensão para a realização deste trabalho.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pelos conhecimentos adquiridos e pela amizade.

Ao Professor Rui Carlos Zambiasi, pelos conhecimentos adquiridos, pela confiança e sua amizade.

À Professora Rosane da Silva Rodrigues, pelos conhecimentos e constante apoio.

À minha família, por tudo que me representa, pelo amor, carinho e força que foram à base para a minha formação como ser humano e como profissional, meu eterno muito obrigada.

Às minhas estagiárias, Marla Sganzerla e Graciele Borges, pelo auxílio na realização deste trabalho e por seu profissionalismo. Aos meus amigos, parte fundamental da minha vida, extensivo aos companheiros de laboratório do DCTA, em especial à amiga Miriane Lucas Azevedo, pelo apoio na vida profissional e pessoal.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	v
ÍNDICE DE TABELAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Mercado de pequenas frutas	3
2.2 Amora-preta	4
2.2.1 Compostos fenólicos	6
2.2.2 Ácido ascórbico	11
2.2.3. Tocoferóis	13
2.2.4 Bioativos e a saúde humana	14
2.3 Geléia <i>light</i>	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Material	19
3.2 Métodos	20
3.2.1 Delineamento experimental	20
3.2.1.1 Tratamentos	21
3.2.2 Processo de elaboração das geléias	21
3.2.3 Determinações físico-químicas gerais	23
3.2.4 Determinação de fenóis totais	24
3.2.5 Determinação de antocianinas totais	24
3.2.6 Determinação de ácido L-ascórbico (vitamina C)	25

3.2.7. Determinação de tocoferóis	26
3.2.8 Determinação de compostos fenólicos individuais	28
3.2.9 Determinação da capacidade antioxidante	29
3.2.10 Determinação instrumental da cor	31
3.2.11 Delineamento estatístico	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
4.1 Determinações físico-químicas do fruto <i>in natura</i> de amora-preta	32
4.1.1 Caracterização físico-química	32
4.1.2 Conteúdo de compostos fenólicos totais e antociânicos totais	34
4.1.3 Conteúdo em ácido L-ascórbico	37
4.1.4 Conteúdo de tocoferóis	38
4.1.5 Conteúdo individual de ácidos fenólicos e de flavanols	40
4.1.6. Determinação da capacidade antioxidante	44
4.1.7 Avaliação instrumental da cor	47
4.2 Determinações físico-químicas das geléias de amora-preta	51
4.2.1 Caracterização físico-química	51
4.2.2 Conteúdo de compostos fenólicos e antociânicos totais	52
4.2.3 Conteúdo em ácido L-ascórbico	55
4.2.4 Conteúdo de tocoferóis	58
4.2.5 Conteúdo individual de ácidos fenólicos e de flavanols	60
4.2.6 Determinação da capacidade antioxidante	64
4.2.7 Avaliação instrumental da cor	66
5 CONCLUSÃO	70
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
APÊNDICE A	79
APÊNDICE B	80
APÊNDICE C	81
APÊNDICE D	82
APÊNDICE E	83
APÊNDICE F	84
APÊNDICE G	85
APÊNDICE H	86

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Tratamentos e delineamento experimental na elaboração de geléias de amora-preta.	20
TABELA 2. Programa do gradiente de eluição dos solventes A e B na determinação de ácido L-ascórbico.	26
TABELA 3. Programa do gradiente de eluição dos solventes na determinação de tocoferóis.	27
TABELA 4. Programa do gradiente de eluição dos solventes A e B para separação e identificação de compostos fenólicos em amora-preta (<i>Rubus</i> sp).	29
TABELA 5. Caracterização físico-química de cultivares de amora-preta (<i>Rubus</i> sp).	32
TABELA 6. Conteúdo total de antocianinas e total de fenóis em amora-preta (<i>Rubus</i> sp.) das cultivares Guarani, Tupy e Brazos.	35
TABELA 7. Conteúdo de ácido L-ascórbico em amora-preta (<i>Rubus</i> sp) das cultivares Guarani, Tupy e Brazos.	38
TABELA 8. Conteúdo de tocoferóis (mg.100g ⁻¹ de amostra) presentes nas cultivares de amora-preta (<i>Rubus</i> sp).	39
TABELA 9. Compostos fenólicos majoritários (em mg. 100g ⁻¹ em ácido gálico) presentes nas cultivares de amora-preta (<i>Rubus</i> sp).	42
TABELA 10. Valores da capacidade antioxidante (DPPH e TEAC) em extratos de amora-preta (<i>Rubus</i> sp.), das cultivares Guarani, Tupy e Brazos.	44
TABELA 11. Valores dos ângulos de cor, luminosidade (L) e coordenadas de cromaticidade a* e b* de amora-preta (<i>Rubus</i> sp) cultivares Guarani, Tupy e Brazos.	48
TABELA 12. Caracterização físico-química das geléias convencional e <i>light</i> de amora-preta (<i>Rubus</i> sp) cv. Tupy.	51
TABELA 13. Conteúdo total de antocianinas e de fenóis em geléias de amora-preta (<i>Rubus</i> sp.) cv. Tupy, durante o período de armazenamento	53
TABELA 14. Conteúdo de ácido L-ascórbico (mg.100g ⁻¹) em geléias convencional e <i>light</i> de amora-preta (<i>Rubus</i> sp) cv. Tupy, no período de armazenamento.	56

TABELA 15. Conteúdo de tocoferóis (em mg.100g ⁻¹) presentes nas geléias convencional e <i>light</i> de amora-preta cv. Tupy (<i>Rubus</i> sp).	59
TABELA 16. Principais ácidos fenólicos (em mg.100g ⁻¹) presentes em geléia convencional e <i>light</i> de amora-preta (<i>Rubus</i> sp) cv. Tupy, durante o período de armazenamento.	61
TABELA 17. Capacidade antioxidante em geléias de amora-preta (<i>Rubus</i> sp.) cv. Tupy, durante o período de armazenamento.	65
TABELA 18. Resultados dos ângulos de cor H ^o (ângulo Hue) em geléias convencional e <i>light</i> de amora-preta (<i>Rubus</i> sp) cv. Tupy, durante o período de armazenamento.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura básica do flavanóide	8
FIGURA 2. Estrutura química da cianidina-3-glicosídeo (a) e da ciandina-3-rutinosídeo (b).	9
FIGURA 3. Estrutura química do ácido gálico (a) e do ácido elágico (b).	10
FIGURA 4. Estrutura química do ácido L-ascórbico (forma ativa de vitamina C).	11
FIGURA 5. Isoformas do tocoferol: alfa-tocoferol (a); beta-tocoferol (b); gama-tocoferol (c); delta-tocoferol (d).	13
FIGURA 6. Comparativo da eletrosfera de um átomo (a) e de um radical livre (b)	15
FIGURA 7. Fluxograma de processamento das geléias convencional e <i>light</i> de amora-preta.	22
FIGURA 8. Estrutura química do DPPH; e mecanismo simplificado da reação do radical livre DPPH com compostos fenólicos.	30
FIGURA 9. Cromatograma típico do ácido L-ascórbico via cromatografia líquida de alta eficiência, com coluna em fase reversa C18 e detector UV a 254 nm.	37
FIGURA 10. Cromatograma típico da separação dos tocoferóis em amora-preta (<i>Rubus</i> sp) cv. Tupy, por HPLC, com coluna de fase reversa e detector de fluorescência a 290 nm de excitação e de 330nm de emissão.	39
FIGURA 11. Cromatograma típico da separação de ácidos fenólicos e flavanols em amora-preta (<i>Rubus</i> sp) via HPLC, com coluna de fase reversa C18 e detector UV a 280 nm.	41
FIGURA 12. Correlação entre o conteúdo de antocianinas totais e a capacidade antioxidante da amora-preta (<i>Rubus</i> sp) das cultivares Guarani, Tupy e Brazos.	45
FIGURA 13. Correlação entre o conteúdo de fenóis totais e a capacidade antioxidante da amora-preta (<i>Rubus</i> sp) das cultivares Guarani, Tupy e Brazos.	46

FIGURA 14. Cultivares de amora-preta (<i>Rubus</i> sp), colhidas em novembro-dezembro de 2005, na estação experimental Embrapa Clima Temperado.	47
FIGURA 15. Representação gráfica dos valores de L, a* e b* obtidos em colorímetro Minolta CR-300, para amora-preta (<i>Rubus</i> sp) das cultivares Guarani, Tupy e Brazos.	49
FIGURA 16. Correlação entre o conteúdo de antocianinas totais e ângulo Hue em amora-preta (<i>Rubus</i> sp) de cultivares Guarani, Tupy e Brazos.	50
FIGURA 17. Cromatograma típico de quantificação de ácido L-ascórbico em geléia <i>light</i> de amora-preta cv. Tupy.	56
FIGURA 18. Cromatograma que representa a separação dos tocoferóis em geléia <i>light</i> de amora-preta (<i>Rubus</i> sp) cv. Tupy.	58
FIGURA 19. Cromatograma típico de identificação de ácidos fenólicos e flavonóis em geléia <i>light</i> de amora-preta (<i>Rubus</i> sp) cv. Tupy.	60
FIGURA 20. Conteúdo de compostos fenólicos na polpa <i>in natura</i> e nas geléias convencional e <i>light</i> de amora-preta cv. Tupy, logo após o processamento.	63
FIGURA 21. Correlação entre o ângulo Hue e o conteúdo de antocianinas totais em geléia convencional de amora-preta cv. Tupy durante o armazenamento a temperatura ambiente.	67
FIGURA 22. Correlação entre o ângulo Hue e o conteúdo de antocianinas totais em geléia <i>light</i> de amora-preta cv. Tupy no armazenamento a temperatura ambiente.	68

RESUMO

O cultivo de amora-preta (*Rubus* sp.) apresenta alto potencial na cadeia produtiva de pequenas frutas no Brasil, sendo uma fonte rica em compostos nutritivos e de antioxidantes naturais. O estudo objetivou quantificar alguns bioativos (compostos fenólicos, tocoferóis e vitamina C), determinar o potencial antioxidante e avaliar a estabilidade destes compostos bioativos durante a elaboração e armazenamento de geléias *light* de amora-preta. Para isto foram realizadas determinações de composição centesimal, ácido L-ascórbico, tocoferóis, fenóis totais, ácidos fenólicos individuais, antocianinas totais e da capacidade antioxidante. Estas determinações foram realizadas em três cultivares de amora-preta *in natura*, Guarani, Tupy e Brazos, e em geléias convencional e *light* obtidas a partir da cv. Tupy durante o período de armazenamento por seis meses. As cultivares apresentaram características físico-químicas similares, destacando-se a cv. Tupy com teor superior de ácido L-ascórbico, elevado conteúdo de antocianinas totais e baixo teor de tocoferóis. As demais cultivares apresentaram baixo conteúdo de ácido L-ascórbico, maior potencial antioxidante e conteúdo superior de tocoferóis. Durante o processo de elaboração das geléias ocorreu uma degradação parcial de todos os compostos avaliados; no entanto, esta degradação foi menos intensa na elaboração da geléia *light*. Os principais ácidos fenólicos identificados, tanto na fruta *in natura* quanto nas geléias foram o ácido p-hidroxibenzóico, ácido gálico e epicatequina. Houve perdas significativas de ácido L-ascórbico no produto processado, sendo que as cinéticas. Durante o armazenamento o ácido fenólico que apresentou maiores perdas foi a catequina, tanto para a geléia convencional quanto para a *light*. As maiores perdas de tocoferóis durante o armazenamento foram verificadas na geléia convencional.

ABSTRACT

The cultivation of blackberry (*Rubus* sp.) shows high potential in the productive chain of small fruit in Brazil, with a source rich in nutritious compounds and natural antioxidants. The study aimed to quantify some phytochemicals (phenolic compounds, tocopherols and vitamin C), determine the antioxidant potential, and evaluate the stability of these phytochemicals for the preparation and storage of blackberry jelly light. For this determinations were made of proximate composition, L-ascorbic acid, tocopherols, total phenols, individual phenolic acids, anthocyanins and total antioxidant capacity. These determinations were performed on three varieties of blackberry in nature, Guarani, Tupy and Brazos, in jelly conventional and light derived from the cv. Tupy during the storage period for six months. The cultivars had similar physical and chemical characteristics, such a cv. Tupy with respect to the higher content of L-ascorbic acid, high content of total anthocyanins and low-tocopherols. The other cultivars had low content of L-ascorbic acid, and antioxidant content greater potential for higher tocopherols. During the drafting process of jelly there was a partial degradation of all the compounds evaluated, but this decline was less intense in the drafting of jelly light. The main phenolic acids identified both in fruit in nature and in jelly were the p-hydroxybenzoic acid, gallic acid and epicatechin. During storage the phenolic acid which showed higher losses was the catechin, both for conventional and for a light jelly. The largest losses of tocopherols during storage were found in conventional jelly.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos vem crescendo a proporção de consumidores que estão modificando seus hábitos alimentares na busca de uma alimentação menos calórica, e com alimentos mais nutritivos e saudáveis. Dentro deste contexto destacam-se os produtos *light*, cuja alegação está associada a uma dieta de baixas calorias. O mercado de produtos *light* já está consolidado e é bastante diversificado, com constantes inovações as quais tem sido direcionada principalmente à obtenção de produtos que apresentem, além de valor calórico reduzido, outros aspectos relevantes do ponto de vista de saúde. A utilização de frutas para o desenvolvimento destes produtos têm sido expressiva, visando atender a esta premissa.

A Região Sul do estado do Rio Grande do Sul tem se destacado pelo potencial na produção de frutas nativas e de pequenas frutas devido às condições climáticas e adaptação de espécies, levando ao aumento da produção da fruta *in natura* e de seus produtos derivados, como sucos, geléias, sorvetes, frutas secas, dentre outros (RASEIRA & ANTUNES, 2004).

A geléia consiste em um dos principais produtos elaborados com frutas nesta região; porém, durante o processamento e armazenamento deste produto ocorrem perdas substanciais de componentes nutricionais característicos presentes na matéria-prima original, incluindo componentes bioativos pertencentes a classe dos compostos fenólicos (flavanóides, ácidos fenólicos e antocianinas), clorofilas, fitosteróis, carotenóides e tocoferóis. O conteúdo destes compostos presentes no fruto *in natura* e em seus produtos derivados pode ser muito variável, pois depende de uma série de fatores, como da cultivar, do grau de maturação, das condições de crescimento, do processamento e da estocagem. Produtos *light*, como as geléias, além de atender a tendência de novos hábitos do consumidor, podem apresentar maior retenção de compostos bioativos, como de ácidos fenólicos e pigmentos naturais, devido ao seu processamento mais brando, pelo menor tempo de exposição do produto a altas temperaturas, comparativamente aos produtos convencionais.

Até o momento, praticamente inexistem dados na literatura quanto a identificação e quantificação individualizada de compostos bioativos nas variedades de amora-preta mais comuns no Brasil (Brazos, Tupy e Guarani) testadas e adaptadas às condições da Região Sul do estado do Rio Grande do Sul, nem

tampouco sobre a estabilidade destes compostos durante a elaboração e estocagem de produtos de baixas calorias (geléias).

O estudo teve por objetivo identificar e quantificar os principais compostos bioativos nas cultivares de amora-preta *in natura* (Guarani, Tupy e Brazos), avaliar a estabilidade destes compostos no processamento e armazenamento de geléias convencional e *light*, e determinar a capacidade antioxidante dos frutos e das geléias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O mercado de pequenas frutas

A mudança no hábito alimentar da população brasileira, observado nos últimos anos, aliada ao aumento do poder aquisitivo da população de baixa renda, propiciou ampla possibilidade de mercado para a produção de frutas frescas e industrializadas no Brasil, destacando-se nos estados do Sul, São Paulo e Sul de Minas Gerais, principalmente se considerar que as condições climáticas destas regiões permitem a oferta de frutas das espécies de clima temperado em diversos períodos do ano (ANTUNES, 2002; RASEIRA & ANTUNES, 2004).

A designação de “pequenos frutos” ou *small fruit*, é utilizada na literatura internacional para referenciar diversas culturas como a do morangueiro, amoreira-preta, framboeseira, groselheira, mirtileiro, entre outros. O cultivo de pequenos frutos caracteriza-se pela elevada exigência de mão-de-obra, e, portanto, deve-se vislumbrar a possibilidade do retorno econômico para suprir os custos de produção (ANTUNES, 2002).

Dentre as várias opções de espécies frutícolas 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 t.ano⁻¹; no entanto, a amoreira apresenta potencial de cultivo em outros estados de características climáticas semelhantes às do Rio Grande do Sul (ANTUNES, 2002; RASEIRA & ANTUNES, 2004).

Devido ao baixo custo de implantação, manutenção, e principalmente pela reduzida utilização de defensivos agrícolas no pomar, a cultura da amora-preta se apresenta como opção da agricultura familiar. Esta é uma cultura de retorno rápido, pois, mesmo em pequena escala no segundo ano de cultivo começa a produção, conferindo ao pequeno produtor opções de renda, pelo destino deste produto ao mercado *in natura* ou industrializado na forma de sucos, frutas em calda, polpa para sorvetes, corantes naturais e produtos geleificados como geléias e doces cremosos (ANTUNES, 2002).

2.2 Amora-preta

O gênero *Rubus* compreende cerca de 400 a 500 espécies, que possuem ampla adaptação climática. Dentre as espécies de maior interesse agrônômico deste gênero destacam-se a *Rubus idaeus* (framboesa) e a *Rubus eubatus* (amora-preta), ambas pertencentes à família *Rosaceae* (ANTUNES, 2002; RASEIRA & ANTUNES, 2004).

A amora-preta pertence ao grupo de bagas, como a groselha, as quais são constituídas por um consistente ou receptáculo, do qual não podem ser facilmente removidas antes da maturação. O número e arranjo das drupas são característicos nos diferentes frutos, existindo numerosas espécies de amora-preta, variadas em tamanho e forma (GREEN, 1971).

A amoreira-preta é uma espécie arbustiva de porte ereto ou rasteiro, que produz frutos agregados, denominados mini drupa ou drupete, onde existe uma pequena semente, pesando cerca de 4 a 7 gramas, de coloração negra e sabor ácido a doce-ácido. Apresenta espinhos em suas principais cultivares comerciais, o que exige muito cuidado do operador durante a colheita com sua integridade física, além de exigir cuidados no seu manuseio para manter a qualidade do fruto (ANTUNES, 2002; RASEIRA & ANTUNES, 2004). É uma espécie rústica e de fácil manejo, apresentando alto potencial de cultivo em regiões brasileiras onde o período de inverno é marcante (SANTOS; RASEIRA; MADAIL, 1997).

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, a considerar as condições climáticas desta região que permite o cultivo de frutas das espécies de clima temperado (ANTUNES, 2002; NACHTIGALL et al., 2004; RASEIRA & ANTUNES, 2004). Além das cultivares inicialmente introduzidas na época: 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).

Dentre as principais cultivares testadas e adaptadas às condições do sul do Brasil destacam-se (RASEIRA & ANTUNES, 2004):

- **Guarani:** originária de sementes é resultado de cruzamentos (*Lawton* x (*Darrow* x *Brazos*)) x (*Shaffertree* x *Brazos*). Foi introduzida pela Universidade de Arkansas nos Estados Unidos e selecionada na Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS). Entre suas características estão a floração durante a todo o mês de setembro e primeira dezena de outubro, e colheita durante o mês de dezembro. Esta planta possui hastes eretas e com espinhos; as frutas são de coloração preta e uniforme, consistência firme, sementes pequenas, película resistente a aroma ativo, sabor doce-ácido, sendo um pouco mais ácido que doce; e o teor de sólidos solúveis varia de 8 a 10° Brix, com peso médio de 5 a 6 gramas.

- **Brazos:** cultivar precoce, lançada pela Texa A&M University, em 1959. Resultou de uma seleção de segunda geração originária do cruzamento entre *Lawton* e *Nessberry*. Possui hastes semi-eretas e com espinhos; as frutas apresentam peso médio em torno de 6 a 7 gramas. O sabor é doce ácido e adstringente e consistência firme, mas se sobressai a acidez e um pouco de adstringência. O teor de sólidos solúveis é, em geral, entre 8,0° e 8,5° Brix, com período de colheita em início de novembro.

- **Tupy:** é atualmente a cultivar de amora-preta mais plantada no Brasil, é resultado do cruzamento das cultivares *Uruguai* e *Comanche*, realizado pela Embrapa Clima temperado em 1982. As plantas são de porte ereto, vigorosas, com espinhos, os frutos apresentam de 7 a 9g de peso médio, sabor equilibrado (acidez/açúcar), consistência firme, película resistente, com teor de sólidos solúveis entre 8 a 9°Brix. A colheita ocorre entre meados de novembro a início de janeiro.

A amoreira-preta *in natura* é altamente nutritiva, pois contém cerca de 85% de água, 10% de carboidratos, elevado conteúdo de minerais (destacando-se o cálcio e potássio, sendo apontada como de interesse no combate à osteoporose e como tônico muscular durante práticas esportivas), além de vitaminas A, C e do complexo B. Uma série de funções são relatados na literatura internacional relacionados às propriedades da amora-preta em função de seus constituintes químicos, estando, entre eles os compostos fenólicos, destacando-se os flavonóides, os quais estão presentes na fruta fresca e em seus produtos, sendo considerados importantes fontes de proteção à saúde (MÄÄTÄ-RIIHINEN, KAMAL-ELDIN, TÖRRÖNEN, 2004; RASEIRA & ANTUNES, 2004; ZADERNOWSKI, NACZK, NESTEROWICZ, 2005).

Devido à sua estrutura frágil e a alta atividade respiratória dos frutos, a vida pós-colheita dos frutos de amora-preta é relativamente curta, o que aumenta a importância e perspectiva de comercialização na forma industrializada, como geléias, sucos, sorvetes e polpas (AGAR et al., 1997; ANTUNES, 2002 e MOTA, abr.- jun.2006).

2.2.1 Compostos fenólicos

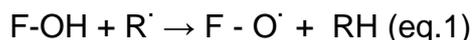
Compostos que apresentam atividade antioxidante ocorrem naturalmente em praticamente todas as plantas, e o maior benefício de uma dieta pode ser pelo aumento de consumo destas substâncias, que dentre as quais estão incluídos os carotenóides, vitaminas (principalmente a vitamina C), tocoferóis, glutathionina, metabolitos endógenos e os compostos fenólicos.

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

Estes compostos, quando presentes em tecidos de plantas, são responsáveis pela capacidade antioxidante que tem sido largamente atribuída aos flavonóides, os quais têm demonstrado agir como quelantes do oxigênio singlete e triplete, seqüestrante de radicais livres e inibidor enzimático, além de atuarem como sinergistas de outros compostos fenólicos (MÄÄTÄ-RIIHINEN, KAMAL-ELDIN, TÖRRÖNEN, 2004, MOYER, 2002; ZADERNOWSKI, NACZK, NESTEROWICZ, 2005; ZAFRILLA, FERRERES, TOMÁS-BARBERÁN, 2001).

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos vem sendo relacionada com sua estrutura química, devido à presença de grupos hidroxil, fatores considerados críticos para a atividade antioxidante (ELISIA et al., 2007).

A capacidade destes compostos de seqüestrar radicais livres é primariamente atribuída à alta reatividade dos substituintes hidroxil (OH^\cdot) ligados ao anel benzopireno presente na estrutura dos flavanóides, que participam segundo a reação (eq.1):



O F-OH representa o flavonóide e R[·] representa o radical livre. Portanto, o grupamento hidroxil cede um átomo de hidrogênio e um elétron para o radical livre, tornando-o estável. Devido à capacidade do grupo aromático de se reestruturar frente ao desaparecimento de elétrons, a estrutura do flavanóide também fica estabilizada (KUSKOSKI et al., 2004). Outro determinante estrutural importante na atividade antioxidante dos flavonóides pode ser a presença dos grupos 4'-OH e 3'-OH. A adição de grupos hidroxil no átomo de carbono orto da posição 4-C aparece para acrescentar um aumento da atividade antioxidante (ROSS & KASUM, 2002).

Mais de 4.000 compostos fenólicos já foram identificados, sendo que a grande maioria destes compostos presente na dieta pertencem a classe dos flavonóides, dos ácidos fenólicos e dos polifenóis (presentes essencialmente na forma de taninos) (KING & YOUNG, 1999). Embora se conheça inúmeros compostos fenólicos presentes em plantas, estes ainda não foram completamente estudados devido à complexidade de sua estrutura química e de sua extensa ocorrência em vegetais (DIMITRIOS, 2006).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários naturalmente presentes nas plantas; são biossintetizados a partir das vias do acetato e do chiquimato. e estão envolvidos no processo de crescimento e reprodução das plantas, na resistência à patógenos e predadores, como protetores de doenças na pré-colheita, além de participar do desenvolvimento e pigmentação da planta (ROSS & KASUM, 2002; SELLAPPAN, AKOH, KREMER, 2004). Como classe geral estes compostos estão presentes em praticamente todos os frutos, mas individualmente são específicos para uma espécie de fruta ou hortaliça.

A presença de compostos fenólicos específicos e sua estabilidade, está relacionada à fatores como o tipo de fruta, variedade, localização geográfica, condições ambientais e climáticas durante o crescimento (fertilização, temperatura, luz e água), presença de doenças na planta, condições de armazenamento pós-colheita e condições de processamento (KING & YOUNG, 1999; ROSS & KASUM, 2002; ZADERNOWSKI, NACZK & NESTEROWICZ, 2005). Os compostos fenólicos também são importantes pela sua contribuição à qualidade sensorial das frutas (cor, *flavour*, incluindo a adstringência); no entanto, estes compostos podem ser afetados

por processos tecnológicos utilizados na preparação de produtos derivados (HO, HOGG & SILVA, 1999; VENDRAMINI & TRUGO, 2004).

Os flavanóides são compostos derivados da benzo- γ -pirona, quimicamente consistindo de cadeias fenólicas e do anel pirano, ocorrendo na forma de agliconas, glicosídeos, ésteres e derivados metilados (Figura 1). A maioria dos flavonóides possuem 15 átomos de carbono no seu núcleo fundamental, que é formado por dois anéis benzênicos (estruturas A e B da Figura 1) ligados por um anel heterocíclico pirano, com dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 (estrutura C da Figura 1). A grande diversidade dos flavonóides é decorrente das variações estruturais devido a diferentes níveis de oxidação, resultando nas flavonas, flavononas, flavonóis, antocianinas e isoflavonas. Os flavonóides diferem quanto ao arranjo dos grupamentos hidroxí, metoxi e glicosídico, e na conjugação entre as cadeias fenólicas ligadas entre si pelo anel pirano, que formam sua estrutura básica (DORTA, 2007). A atividade antioxidante dos flavonóides e de seus metabólitos depende do arranjo de seus grupos funcionais na estrutura molecular.

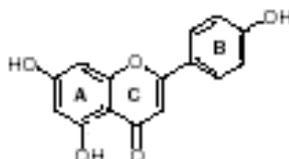


FIGURA 1. Estrutura básica do flavanóide.

Fonte: Skerget et al., 2005.

Os três flavonóis mais comuns são a quercetina, miricetina e o campferol. A quercetina, quantitativamente, é o principal constituinte fenólico em plantas (KING & YOUNG, 1999; MAMEDE & PASTORE, 2004; SIRIWOHARN, WROLSTAD & FINN, 2004).

No grupo dos flavonóis estão presentes a (+) catequina e a (-) epicatequina, as quais ocorrem frequentemente na forma combinada com ácido gálico ou na forma de polímeros em taninos condensados (KING & YOUNG, 1999; MAMEDE & PASTORE, 2004; SIRIWOHARN, WROLSTAD & FINN, 2004).

As isoflavonas pertencem exclusivamente à família das leguminosas, e ocorrem em grandes quantidades somente em soja e seus produtos derivados. Os

principais compostos deste grupo são a genisteína e a daidzeína (KING & YOUNG, 1999).

As antocianinas consistem em um dos maiores grupos de pigmentos hidrosolúveis, são responsáveis pela cor vermelha, roxa e azul de muitas frutas, vegetais e flores. A estrutura básica das antocianinas é formada pelo grupo flavílio (2-fenil-benzopirilo), ocorrendo na forma de derivados polihidroxi e polimetoxi do sal flavilium. Dentre as principais antocianinas presentes em “pequenos frutos” estão incluídas a cianidina-3-glucosídeo (Figura 2a), cianidina-3-rutinosídeo (Figura 2b), delphinidina-3-glucosídeo, delphinidina-3-rutinosídeo e pequenas quantidades de pelargonidina-3-rutinosídeo, malvidina e peonidina-3-rutinosídeos (DAO et al., 1998; DUGO et al., 2001; MAMEDE & PASTORE; 2004);

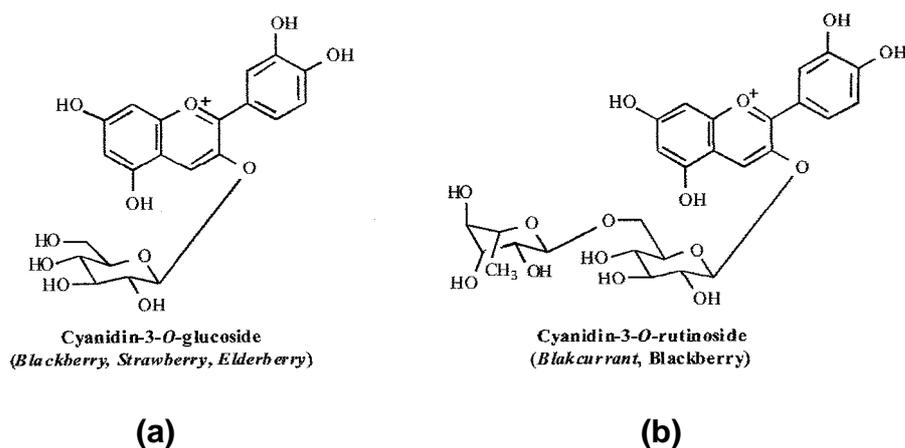


FIGURA 2. Estrutura química da cianidina-3-glicosídeo (a) e da cianidina-3-rutinosídeo (b).

Fonte: Beattie et al., 2005.

Dentre os compostos fenólicos que não pertencem à classe dos flavonóides estão os ácidos fenólicos, os quais são classificados em ácidos hidroxibenzóicos e derivados do ácido benzóico, comumente presente no estado livre ou combinado à ésteres ou glicosídeos, tendo como principais representantes o ácido gálico (Figura 3a) e ácido elágico (Figura 3b); e os ácidos hidroxicinâmicos, que são derivados do ácido cinâmico, os quais ocorrem comumente na forma livre ou na forma de ésteres e éteres, tendo como compostos majoritários os ácidos p-cumárico, ferrúlico e

cafeico (AMAKURA et al., 2000; KING & YOUNG, 1991; SIRIWOHARN, WROLSTAD & FINN, 2004).

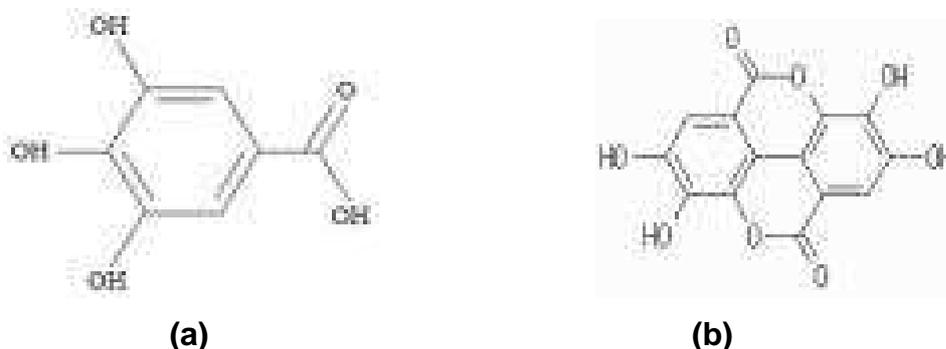


FIGURA 3. Estrutura química do ácido gálico (a) e do ácido elágico (b).

Fonte: Malacrida & Motta, 2006.

O ácido elágico ($C_6H_6O_8$) apresenta-se como um dos ácidos fenólicos de maior relevância, e tem sido reportado em vários estudos pela sua representabilidade em frutos de amora-preta. Este composto é um hidrólito da elagitanina, produto da condensação do ácido gálico, que pode estar presente nas plantas na forma de ácido elágico livre, de ácido elágico glicosídeo ou de elagitaninas, a qual é a mais comum (HAKKINEN, 2000; MATTILA & KUMPULAINEN, 2002; SHAHRZAD & BITSCH, 1996; ZAFRILLA, FERRERES & TOMÁS-BARBERÁN, 2001).

A avaliação de "pequenas frutas" como fonte de compostos bioativos quanto a sua ação antioxidativa, está associada a fatores relacionados a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (MÄÄTTÄ-RIIHINEN, KAMAL-ELDIN, TÖRRÖNEN, 2004). A funcionalidade destes compostos baseia-se em sua ação como inibidor de radicais livres e como seqüestrante de enzimas e metais, os quais estariam envolvidos em alterações patológicas como da aterosclerose, cataratas, câncer, patologias cerebrais e de inflamações crônicas (GARCIA-ALONSO et al., 2004; SELLAPPAN et al., 2002; SIRIWOHARN et al., 2004; ZADERNOWSKI et al., 2005).

2.2.2 Ácido ascórbico

A vitamina C (Figura 4) é um importante componente de qualidade em muitas frutas, particularmente em pequenas frutas; porém, a amora-preta apresenta conteúdos inferiores desta vitamina (cerca de $20 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) quando comparado com o conteúdo de várias outras pequenas frutas (AGAR et al., 1997; BARBOZA, 1999).

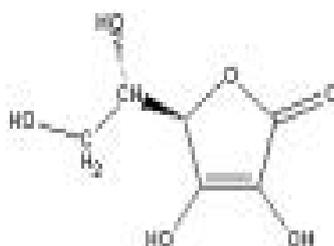


FIGURA 4. Estrutura química do ácido L-ascórbico (forma ativa de vitamina C).

Fonte: Davies, Austin & Partidge, 1991.

A vitamina C é uma das principais vitaminas para a nutrição humana, atua na prevenção do escorbuto, na manutenção saudável da pele e dos vasos sanguíneos, na formação do colágeno, na absorção de ferro inorgânico e na redução do nível de colesterol (BURDULU, 2005; CHAMPE, 1996). O ácido L-ascórbico (AA) é a forma biologicamente mais ativa da vitamina C, e também apresenta atividade antioxidante. Os processos de degradação do AA, que podem ocorrer por via anaeróbica e aeróbica, dependem de fatores como da concentração de oxigênio, calor, luz, temperatura e tempo de estocagem (BURDULU et al., 2006). A forma inicial resultante da oxidação reversível da vitamina C é o ácido dehidroascórbico, que exibe cerca de 80% da atividade biológica de seu precursor não oxidado. Pertencem também ao grupo de compostos da vitamina C, o ácido eritórbico e o ácido D-isoascórbico, que são estereoisômeros do ácido L-ascórbico, mas que apresentam somente 5% de atividade vitamínica (FONTANNAZ et al., 2006; HERNÁNDEZ et al., 2006; HIDIROGLOU et al., 1998).

Nos alimentos, o ácido ascórbico possui uma função muito importante, devido à sua ação fortemente redutora. Este composto é amplamente empregado como agente antioxidante para estabilizar cor, sabor e aroma de alimentos. É utilizado

ainda como conservador e para o enriquecimento ou restauração, a níveis normais, do valor nutricional perdido durante o processamento (ANGELUCCI et al., 1987).

O ácido ascórbico é uma substância estável em solução ácida. O pH alcalino, aquecimento, concentração inicial do ácido, relação do ácido ascórbico: ácido dehidroascórbico e a presença de metais (principalmente cobre e ferro) são fatores que podem influir sobre os mecanismos degradativos do ácido ascórbico (COULTATE, 1994).

O ácido ascórbico é muito sensível a diversas formas de degradação, apresentando-se como uma das formas mais instáveis. A taxa de degradação dessa vitamina está diretamente associada ao processamento, manuseio, armazenamento e consumo dos alimentos aos quais está presente. A principal causa da degradação da vitamina C em alimentos consiste em sua oxidação, incidindo na formação subsequente de furaldeídos, que facilmente se polimerizam, resultando na formação de pigmentos escuros. A oxidação da vitamina C pode ser via enzimática, através da ascorbato oxidase, citocromo oxidase e peroxidase, mesmo embora, durante o processamento de alimentos, as perdas de vitamina C devido a ação enzimática sejam mínimas. As principais perdas se devem a reações não enzimáticas, oxidativas e não oxidativas, as quais são aceleradas pela redução do pH do meio (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

Durante o processamento ou armazenamento, podem ocorrer perdas da vitamina C através de uma série de rotas diferenciadas; porém, poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar as rotas metabólicas que estão envolvidas em cada alimento específico (FENNEMA, 1993).

Devido a sua alta solubilidade em água, o ácido ascórbico é facilmente perdido por lixiviação a partir das superfícies expostas do fruto. As maiores perdas têm se observado durante o branqueamento ou por lixiviação durante o processamento, com um percentual de perda variando segundo o tipo de alimento e da concentração inicial de ácido ascórbico no produto (HOWARD et al., 1994).

2.2.3 Tocoferóis

Os tocoferóis (precursores da vitamina E) constituem um importante grupo na dieta humana, estando vinculados às funções biológicas gerais, incluindo a atividade vitamínica, capacidade antioxidante, modulação da função imune e regulação da diferenciação e proliferação celular (GRANADO-LORENCIO et al., 2007).

A vitamina E é considerada como fator de proteção de aproximadamente 80 tipos de doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, danos nas membranas das células e do DNA, oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, entre outros. O alfa-tocoferol, é a forma mais comum de vitamina E presente na natureza, e é a sua forma mais biologicamente ativa. Este tocoferol consiste na principal vitamina com capacidade antioxidante transportada pela corrente sanguínea pela fase lipídica das partículas lipoprotéicas. Junto com o beta-caroteno e outros antioxidantes naturais, chamados ubiquinonas, a vitamina E protege os lipídios da peroxidação *in vivo* (CHING & MOHAMED, 2001; SOUZA et al., 2003).

A vitamina E é composta de quatro variantes de tocoferol (Figura 5) e quatro variantes de tocotrienóis. Tocoferóis e tocotrienóis são designados como α -, β -, γ - e δ -, de acordo com o número e posição dos grupos metil na cadeia (Figura 5).

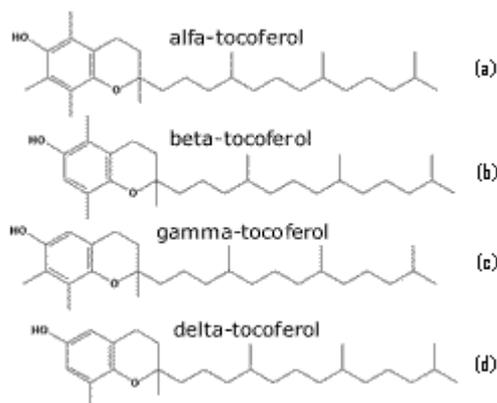


FIGURA 5. Formas do tocoferol: α -tocoferol (a); β -tocoferol (b); γ -tocoferol (c); e δ -tocoferol (d).

Fonte: Vitamina E, 2005.

A rota da vitamina E no organismo pode ser explicada em geral como um lipídio antioxidante na estabilização de membranas subcelulares, mas se tem observado que participam de mais atividades vitamínicas (DÍAZ et al, 2007; SIQUEIRA et al, 1997). A sua função 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 et al., 1997).

A vitamina E apresenta pouca resistência ao aquecimento e a ação de ácidos, sendo instável a ação de agentes alcalinos, da luz ultravioleta e 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 extração na cocção (RICE-EVANS & MILLER, 1995; SIQUEIRA et al, 1997).

2.2.4 Bioativos e a saúde humana

Estes compostos têm sido recentemente investigados cientificamente devido sua importância na promoção da saúde e prevenção de doenças. Devido à associação de uma dieta rica em frutas e hortaliças e o decréscimo da incidência de várias doenças, têm sido consideradas como evidências epidemiológicas (GARCÍA-ALONSO et al., 2004).

Vários estudos têm demonstrado que a presença de radicais livres no organismo causa danos oxidativos em diferentes moléculas, como lipídios, proteínas e ácidos nucléicos; o estresse oxidativo leva a formação de câncer, aterosclerose, isquemia, inflamações e doenças neurodegenerativas, entre outros (BUTKOVIC, KLASINC & BORS, 2004; GARCÍA-ALONSO et al., 2004).

Espécies reativas do oxigênio são formadas *in vivo* durante o metabolismo aeróbio normal e acúmulo pode chegar a um nível crítico e levar ao desenvolvimento de várias doenças. A ação de radicais livres também pode causar danos oxidativos no DNA, o qual desempenha um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

As moléculas orgânicas ou inorgânicas e os átomos que contém um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres. Essa configuração confere aos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais. Algumas espécies de radicais livres são: oxigênio singlete (1O_2), radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH), óxido nítrico (NO^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

A figura 6 representa o orbital de um átomo (esquerda) e de um radical livre (direita).

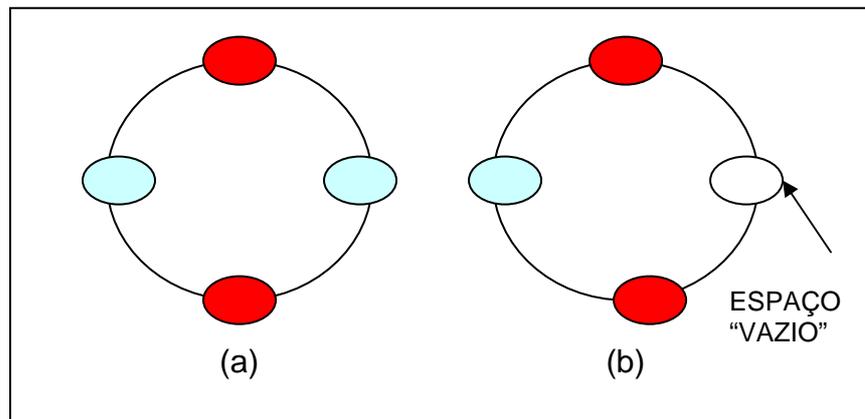


FIGURA 6. Comparativo da eletrosfera de um átomo (a) e de um radical livre (b)

Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo mecanismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídios, nos aminoácidos das proteínas, na dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e nas bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenóides, são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Dentre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e freqüentemente encontrados são os compostos fenólicos, principalmente os flavonóides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à capacidade de seqüestrar os radicais livres. Os compostos fenólicos podem inibir os processos da oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Alguns desses compostos podem inclusive apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Os flavonóides e os ácidos fenólicos vem despertando muito interesse pela observação de seus efeitos biológicos *in vitro*, tais como em seu potencial antioxidante (atividade de seqüestrante de metais e captador de radicais livres), na modulação do sistema de atividade enzimática, na inibição da proliferação celular e possível benefício em rotas da saúde humana (MAMEDE & PASTORE, 2004; ROSS & KASUM, 2002). Vários estudos *in vitro* demonstram que os flavonóides incluindo ácidos fenólicos, antocianinas, flavanóis, flavonóis e isoflavonas, possuem atividade antioxidante (ROSS & KASUM, 2002).

Os flavonóides são efetivos antioxidantes em ampla faixa de sistemas de oxidação química, demonstrado pela sua habilidade de seqüestrar radicais peroxil, radicais alquil peroxil, radicais superóxido peroxil, tanto em ambientes aquosos quanto em ambientes orgânicos. Recentes estudos sugerem que alguns flavonóides podem proteger contra os radicais livres por um mecanismo que direciona somente para o seqüestro do radical livre, devido a sua habilidade de doar elétrons do grupo hidroxil da sua estrutura. Essa capacidade também é influenciada pela atividade quelante de metais de transição e pela capacidade de inserção no interior nas membranas biológicas (DORTA, 2007).

Em adição às propriedades de seqüestrantes dos radicais livres, alguns flavonóides podem formar quelatos com íons de metais (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e inibem a ativação da reação da lipoxigenase (MARTINEZ-FLÓREZ et al., 2002; ROSS, J.A.; KASUM, 2002). Atuam também na inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), devido possuírem múltiplos grupos hidroxil, especialmente grupos 3', 4' o-dihidroxi, que são geralmente os antioxidantes mais efetivos em processos oxidativos (MEYER, HEINONERN & FRANKEL, 1998).

2.3 Geléia *light*

Geléia é o produto obtido pela cocção de frutas inteiras ou em pedaços, polpa ou suco de frutas, adicionado de açúcar e água e concentrado até consistência gelatinosa. Pode ser adicionado de glicose ou açúcar invertido, e não pode ser colorida e nem aromatizada artificialmente. É tolerada a adição de acidulantes e de pectina, para compensar qualquer deficiência no conteúdo natural de pectina ou de acidez da fruta.

A consistência deve ser tal que, quando removidas de seus recipientes, sejam capazes de manter-se no estado semi-sólido. As geléias transparentes, que não contiverem em sua massa pedaços de frutas deverão, ainda, apresentar elasticidade ao toque, retomando a sua forma primitiva após ligeira pressão (JACKIX, 1988).

Portanto três são os componentes indispensáveis para a elaboração de uma geléia: a pectina, o ácido e o açúcar. A pectina constitui-se no elemento fundamental

necessário à formação do gel, e deverá ser adicionada quando a fruta não é suficientemente rica em pectina. O ácido também é necessário para a formação do gel, e quando faltar na fruta poderá ser adicionado na forma de ácidos permitidos por legislação nas proporções de 0,1 a 0,5%. O açúcar é o outro constituinte indispensável na elaboração de geléias convencionais; os mais prontamente solúveis são sacarose e glicose. O teor de sólidos solúveis finais da geléia convencional deve se entre 65 a 70% (GAVA, 1984).

Durante o processamento da geléia, as altas temperaturas conjuntamente com o tempo de exposição, ocorre a concentração de compostos, devido à evaporação da água. A presença de açúcar ocasiona um aumento da pressão osmótica do meio e redução da atividade de água, criando condições desfavoráveis para o crescimento de microorganismos.

O aumento da oferta de mercado por alimentos *light*, estimulou o uso de frutas como ingredientes, pois permite a obtenção de produtos com baixo valor calórico e com características semelhantes aos alimentos convencionais, impulsionados por consumidores preocupados com uma alimentação mais saudável e com a forma física (CHIM, 2004; NACHTIGALL et al., 2004).

Segundo a Legislação Brasileira, alimentos *light* são aqueles que apresentam uma redução de no mínimo 25% em algum de seus ingredientes característicos, quanto aos teores de sódio, açúcares, gorduras, colesterol ou valor energético (BRASIL, 1998). Em produtos derivados de frutas (como a geléia), o ingrediente que pode ser reduzido é o açúcar, com conseqüente redução em calorias. As geléias *light* são produtos de baixo teor de sólidos e requerem maior quantidade de fruta que o produto convencional, além de utilizar-se de pectina de baixo teor de metoxilação, as quais formam gel em presença de íons metálicos, não necessitando da presença de açúcares. O processamento é similar ao da geléia tradicional, porém o volume de água a ser evaporado é menor, acarretando menor exposição ao calor, supostamente preservando melhor os componentes nutricionais. Nestes produtos, parte do açúcar é substituído por edulcorantes, que em proporções adequadas, conferem um poder adoçante equivalente à quantidade de açúcar removido (CHIM, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Foram utilizadas frutas *in natura* de amora-preta (*Rubus sp*), das cultivares Brazos, Tupy e Guarani, cultivadas na região de Pelotas-RS e colhidas no período de novembro a dezembro de 2005, em campos experimentais da Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS). Os frutos foram colhidos, selecionados, de acordo com o grau de sanidade visual, e embalados em sacos de polietileno de alta densidade (0,45 micra), sendo então congelados em ultra-freezer a -80°C até o momento da realização das análises.

Para elaboração das geléias foram usados: sacarose comercial, pectina de alto (ATM) e baixo (BTM) grau de metoxilação (marca CPKelco), cloreto de cálcio p.a., ácido cítrico p.a., benzoato de potássio p.a. e o edulcorante aspartame (marca Chemax).

Utilizou-se de padrões cromatográficos da Sigma (St. Louis, MO) e Fluka (Milwaukee, WI): ácido L-ascórbico; ácidos hidroxicinâmicos: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico; ácidos hidroxibenzóicos: ácido gálico, ácido elágico, ácido p-hidroxibenzóico; flavonols: quercetina, kaempferol, miricetina e flavanols: (+) catequina, (-) epicatequina, α -, δ - e γ - tocoferol; e de reagentes p.a.: DPPH-2,2-difenil-1-picrilhidrasila (Sigma) e TROLOX-ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Sigma).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Delineamento Experimental

Inicialmente fez-se uma caracterização de três cultivares de amora-preta (Guarani, Tupy e Brazos), quanto aos seus parâmetros físico-químicos.

Devido à estrutura frágil e alta atividade respiratória dos frutos, a vida pós-colheita da amora-preta é relativamente curta, por isto, com o aumento de produção, os frutos são comercializados preferencialmente na forma industrializada. Assim, baseado na composição físico-química, escolheu-se uma cultivar de amora-preta, a qual apresentasse o maior conteúdo de compostos bioativos, para a elaboração de um produto de amora-preta na forma de geléia.

Na a elaboração das geléias, o experimento constou de 24 amostras decorrentes do delineamento estatístico inteiramente casualizado da polpa da cultivar pré-selecionada de amora-preta e 8 tratamentos (2 formulações de geléias x 4 períodos de armazenamento), com três repetições, sendo avaliados os parâmetros físico – químicos (Tabela 1).

TABELA 1. Tratamentos e delineamento experimental na elaboração de geléias de amora-preta.

Tratamento	Variáveis Independentes		Variáveis dependentes
	Geléias	Tempo de armazenamento	
1	Padrão	T1	Composição química, fenóis totais, antocianinas totais, Capacidade antioxidante, cor, vitamina C (ácido L-ascórbico), compostos fenólicos individuais e tocoferóis.
2	Padrão	T2	
3	Padrão	T3	
4	Padrão	T4	
5	<i>Light</i>	T1	
6	<i>Light</i>	T2	
7	<i>Light</i>	T3	
8	<i>Light</i>	T4	

T1- Imediatamente após o processamento; T2 – dois meses de armazenamento; T3 – quatro meses de armazenamento; T4 – seis meses de armazenamento.

3.2.1.1 Tratamentos

A variável independente formulação consistiu em duas diferentes formulações de geléias, uma convencional (controle) e a outra com redução de calorias (*light*):

- F1 – geléia convencional (1:0,7 p/p, em relação ao teor de polpa e sacarose);

- F2 – geléia *light* com aspartame (1:0,35 p/p, em relação ao teor de polpa e sacarose); consistindo na redução de 50% de sacarose em relação a formulação convencional.

A variável independente tempo de armazenamento correspondeu a estocagem por seis meses à temperatura ambiente e luminosidade artificial (lâmpada fluorescente), e foi composta por quatro pontos de avaliações:

- T1 – Imediatamente após o processamento (0 meses de armazenamento);
- T2 - dois meses de armazenamento;
- T3 - quatro meses de armazenamento;
- T4 - seis meses de armazenamento.

As variáveis dependentes consistiram nas avaliações físico-químicas (tabela 1).

3.2.2 Processo de elaboração das geléias

Os frutos foram descongelados e lavados em água clorada (25mg.L^{-1} de cloro livre) e selecionados visualmente quanto aos características da cultivar. Após a retirada do excesso de água, os frutos foram acondicionados em sacos de polietileno, transportados para o laboratório de análise de alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e armazenados em ultra-freezer a -80°C .

Os frutos foram descongelados em refrigerador, depois foram colocados em bandejas fora do refrigerador até atingir a temperatura ambiente, sendo então triturados em liquidificador doméstico até a obtenção de uma polpa homogênea.

Na formulação da geléia convencional utilizou-se uma parte de polpa para 0,7 partes de sacarose em peso; 0,8 p/p (em relação ao peso da sacarose) de pectina de alto grau de metoxilação; 0,3 p/p (em relação ao peso da sacarose) de ácido cítrico; 10% de glicose (em relação à quantidade de sacarose); e 0,05% de conservante benzoato de sódio (em relação à quantidade de polpa); com tempo de processamento de 20 minutos.

Para a formulação de geléia *light* utilizando-se uma parte de polpa para 0,35 partes de sacarose; 1,5 p/p (em relação ao peso da sacarose) de pectina de baixa

metoxilação; 0,3 p/p (em relação ao peso da sacarose) de ácido cítrico; cloreto de cálcio (55 mg por g de pectina); 0,05% de ácido benzóico (em relação a quantidade de polpa); e 1:0,0045 p/p (em relação ao peso de sacarose) do edulcorante aspartame, calculado com base no seu equivalente de doçura (200 vezes mais doce que a sacarose); com tempo de processamento de 13 minutos.

A elaboração das geléias foi realizada em tacho aberto, segundo o fluxograma da Figura 7.

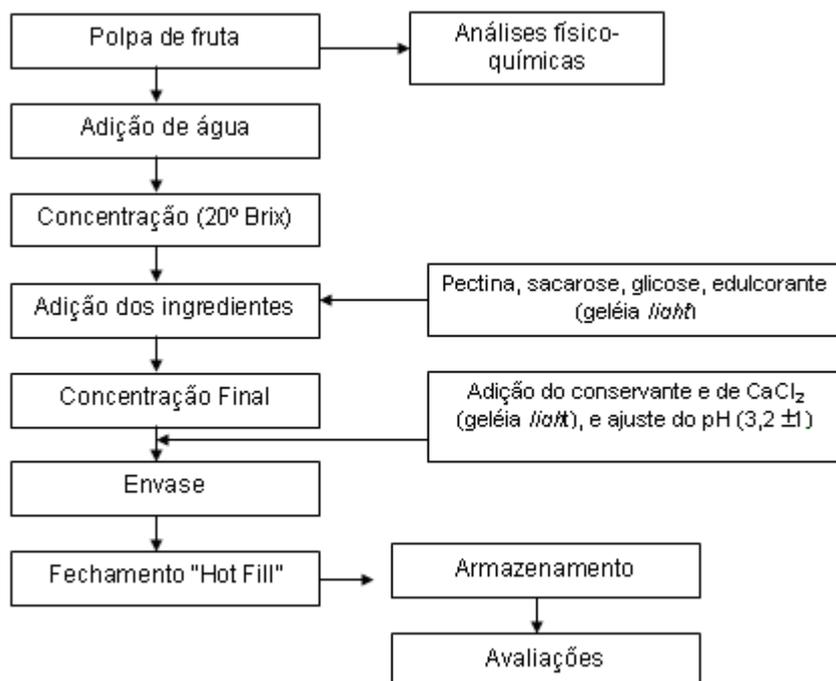


FIGURA 7. Fluxograma de processamento das geléias convencional e *light* de amora-preta.

A mistura foi concentrada até o teor de sólidos de 68° Brix para a geléia convencional e de 43°Brix para a geléia *light*. Após atingir o teor de sólidos desejado, as geléias foram retiradas do aquecimento e acrescidas de ácido cítrico para ajuste do pH final na faixa de 3,2, do conservante benzoato de potássio, segundo o limite estabelecido pela ANVISA RDC nº 34 (BRASIL b, 2001), e de cloreto de cálcio (50mg.g⁻¹) nas geléias *light*, para ocorrer o estabelecimento do gel. As geléias foram então envasadas em frascos de vidro com capacidade de 250 gramas, previamente esterilizados, e o fechamento foi realizado manualmente ainda à quente. Logo após o fechamento inverteu-se as embalagens por 30 minutos, deixando posteriormente armazenadas em local seco à temperatura ambiente.

3.2.3 Determinações físico-químicas gerais

Foram realizadas determinações físico-químicas na matéria-prima *in natura* (polpa de amora-preta recentemente descongelada) e nas diferentes formulações de geléias, as quais foram avaliadas imediatamente após o processamento e aos dois, quatro e seis meses de armazenamento. As determinações foram realizadas em triplicata, de acordo com as metodologias:

- Proteína: método de Kjeldahl expressa em % (Instituto Adolfo Lutz, 1985);
- Extrato etéreo: método gravimétrico de extração pelo extrator de Soxhlet, expresso em % (Instituto Adolfo Lutz, 1985);
- Fibras: método gravimétrico, expressas em % (Instituto Adolfo Lutz, 1985);
- Cinzas: método gravimétrico, expressas em % (Instituto Adolfo Lutz, 1985);
- Umidade: método gravimétrico de secagem em estufa à 105°C até peso constante, expressa em % (Instituto Adolfo Lutz, 1985);
- pH: método potenciométrico, com amostra à temperatura ambiente;
- Acidez: método volumétrico, titulação com NaOH 0.1N, expressa em % de ácido málico (Instituto Adolfo Lutz, 1985);
- Sólidos solúveis: realizando a leitura em refratômetro de Abbé, à 20°C, expressos em ° Brix;
- Açúcares Totais: método volumétrico, titulação com solução de Fehling, expressos em % de glicose (Instituto Adolfo Lutz, 1985);
- Açúcares Redutores: método volumétrico, titulação com solução de Fehling, expressos em % de glicose (Instituto Adolfo Lutz, 1985);
- Açúcares Não Redutores: determinados por diferença entre açúcares totais e não redutores, expressos em % de sacarose (Instituto Adolfo Lutz, 1985);
- Determinação do valor calórico total: segundo a Resolução – RDC, nº 40 de 21 março de 2001, expresso em Kcal (BRASIL a, 2001).

3.2.4 Determinação de fenóis totais

O conteúdo total de compostos fenólicos foi estimado colorimetricamente usando a adaptação do método de Folin-Ciocalteu (SIGNGLETON & ROSSI, 1965; SELLAPPAN, AKOH & KREWER, 2002). Uma alíquota de um (1) mL do suco da polpa ou de geléia foi adicionada de 60mL de água deionizada, 5mL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,2N e de 20mL de solução de carbonato de sódio saturada (20%), sendo então homogeneizada. A absorvância foi mensurada a 765 nm em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 UV/Visível (Pharmacia Biotech), após incubação de duas horas a temperatura ambiente. A quantificação foi baseada no estabelecimento de uma curva padrão com 0,5; 10; 15; 25 e 50 mg.100g⁻¹ de ácido gálico, obtendo-se uma equação da reta expressa por $y = 438,57x - 10,478$, com R²: 0,9984. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por 100 gramas de peso do fruto *in natura*.

3.2.5 Determinação de antocianinas totais

O conteúdo total de antocianinas foi estimado colorimetricamente segundo o método de Lees e Francis (1972), com pequenas adaptações. Para a extração dos compostos antociânicos utilizou-se uma (1) grama de amostra, adicionou-se 25 mL de solução extratora de etanol pH 1,0 e incubou-se por uma (1) hora a temperatura ambiente. Após efetuou-se a leitura em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 UV/Visível (Pharmacia Biotech), no comprimento de onda de 520 nm, o qual representa o espectro de absorção das antocianinas presentes em frutos de amora-preta (MOTA, R. V de, 2006), realizando a leitura do branco representado pela solução de etanol pH 1,0. A quantificação de antocianinas totais baseou-se no coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glicosídeo (eq. 2), a qual representa a principal antocianina presente em frutos de amora-preta, perfazendo entre 66-80% do total de antocianinas (MOTA, 2006). O cálculo da concentração de antocianinas é baseado na Lei de Beer (eq.2) e os resultados foram expressos em miligramas de cianidina 3-glicosídeo por 100 gramas de fruto fresco.

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l \quad (\text{eq.2})$$

Onde: A= absorvância

ϵ = Coeficiente de absorção molar
C = concentração mol/L
l = caminho óptico em cm

3.2.6 Determinação de ácido L-ascórbico (vitamina C)

Inicialmente dez gramas de amostra foram dissolvidas em 30 mL de solução de ácido metafosfórico a 4,5% em água ultra pura, após filtrou-se e completou-se o volume para 50 mL em água ultra pura. Do filtrado retirou-se uma alíquota de 1,5 mL e centrifugou-se por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e uma alíquota de 20 μ L da amostra foi injetada em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

A análise de cromatografia líquida de alta eficiência consistiu no sistema HPLC-Shimadzu, equipado com injetor automático e detector UV-visível (254 nm). A separação foi desenvolvida em coluna de fase reversa RP-18 (5 μ m, 4,6 mm x 150 mm) com fase estacionária octadecil, operando a temperatura de 25°C com fluxo de 0,8 mL.min.⁻¹. A eluição foi efetuada utilizando um sistema de gradiente utilizando as fases móveis A (99,9:0,1% v/v, água ultra pura:ácido acético p.a.) e B (100% metanol) (Tabela 2), seguindo a metodologia adaptada de Vinci et al. (1995) e Ayhan et al. (2001).

TABELA 2. Programa do gradiente de eluição dos solventes A e B na determinação de ácido L-ascórbico.

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

Solvente A: solução de água ultra pura:ácido acético p.a. (99,9:0,1% v/v); solvente B: 100% de metanol.

Para a quantificação de vitamina C utilizou-se a curva de padrão externo quadrática (Apêndice A), preparada com ácido L-ascórbico (reagente padrão para análise com 99,97% de pureza), em concentrações que variaram de 10, 25, 50, 75 e 100 mg.100 mL⁻¹, utilizando-se como fase móvel o mesmo sistema de gradiente utilizado na determinação da vitamina C, com tempo total de corrida de 10 minutos, e fluxo de 0,8 mL.min.⁻¹.

3.2.7. Determinação de tocoferóis

Para a extração de tocoferóis, utilizou-se a metodologia adaptada de Rodriguez-Amaya (2001), onde se adicionou aproximadamente três gramas de celite a cerca de vinte gramas de amostra (triturada), homogeneizando-a. A seguir adicionou-se 20 mL de acetona gelada e procedeu-se a agitação por 10 minutos. Após filtrou-se a amostra a vácuo, lavando o resíduo com acetona até que o mesmo fique incolor.

Após transferiu-se o filtrado para um funil de separação e acrescentou-se éter de petróleo e água destilada até completar o volume final do balão. A fase aquosa (parte inferior) foi descartada e continuou-se lavando a fase superior com água destilada para a remoção total da acetona. Após aferiu-se o balão com éter de petróleo. O extrato foi transferido para tubos eppendorf, centrifugou-se nas condições de 9.000 rpm por 6 minutos, utilizando-se o sobrenadante para a avaliação dos tocoferóis.por cromatografia líquida, utilizando-se 20 µL.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência consistiu no sistema HPLC-Shimadzu, equipado com injetor automático e detector de fluorescência, com comprimentos de onda de excitação e de emissão, 290 e 330 nm, respectivamente. A separação foi desenvolvida em coluna de fase reversa RP-18 (5µm, 4,6 mm x 150 mm) com fase estacionária octadecil, operando a temperatura de 25°C com fluxo de 1,0 mL.min.⁻¹. A separação foi efetuada utilizando um sistema de eluição por gradiente, utilizando as fases móveis A (100% metanol), B (100% de acetonitrila) e C (100% de isopropanol) (Tabela 3), seguindo a metodologia adaptada de Zambiasi (1997).

TABELA 3. Programa do gradiente de eluição dos solventes na determinação de tocoferóis.

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

Solvente A: 100% metanol; solvente B: 100% Acetonitrila; solvente C: 100% isopropanol.

Para a quantificação de α -, δ - e γ - tocoferol utilizou-se uma curva de padrão externo (Apêndice B), preparada com os padrões cromatográficos correspondentes. A quantificação de β - tocoferol foi realizada baseado na curva de calibração do δ - tocoferol, porque estes dois compostos não são separados no processo cromatográfico, e portanto, são quantificados conjuntamente. Para a elaboração da curva padrão de α -tocoferol, utilizou-se concentrações de 0,156; 0,312; 0,625; 1,250; 2,500; 5,000; e 7,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; para o γ -tocoferol utilizou-se concentrações que variaram de 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,250; 2,500; e de 5,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; e para o δ - tocoferol utilizou-se soluções de concentrações de 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,250; 2,500; e de 5,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na elaboração das curvas padrões utilizou-se a mesma fase móvel utilizada na separação da amostra (tabela 3), com tempo total de corrida de 15 minutos e fluxo de 1,0 mL.min^{-1} .

O conteúdo total de tocoferóis na amostra, expresso em mg.100g^{-1} de amostra, foi determinado pela soma dos tocoferóis individuais.

3.2.8 Determinação dos compostos fenólicos individuais

Os compostos fenólicos foram extraídos da polpa dos frutos e das geléias usando o método descrito por Häkkinen et al. (1998), com pequenas modificações. Cinco gramas da amostra macerada foram dissolvidas em 30 mL de metanol, após foi adicionado 4,9 mL de ácido clorídrico p.a. (concentração final de HCl 1,2 M) para a estabilização dos composto fenólicos, sendo completado o volume em balão volumétrico de 50 mL com metanol. O extrato foi homogeneizado em banho de água a 35°C, na ausência de luz por 24 horas. Após este período, a mistura foi filtrada e o sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador a 40°C por cerca de 30 minutos. O resíduo concentrado foi redissolvido em metanol até o volume final de 5 mL, o qual foi centrifugado (7.000 rpm por 10 minutos), sendo então injetado uma alíquota de 30µL no cromatógrafo.

O cromatógrafo consistiu no sistema HPLC-Shimadzu, com injetor automático, detector UV-visível a 280 nm, coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (5µm, 4,6 mm x 150 mm) com fase estacionária octadecil e uma coluna de guarda CLC-G-ODS (4) com fase estacionária de superfície octadecil. A fase móvel consistiu em um gradiente de eluição (Tabela 4) com solução aquosa de ácido acético (99:1, %v/v) (A) e 100% de metanol (B), com fluxo de 0,8 mL/ min e tempo total de corrida de 45 minutos, segundo metodologia descrita por Zambiasi (1997).

TABELA 4. Programa do gradiente de eluição dos solventes A e B para separação e identificação de compostos fenólicos em amora-preta (*Rubus* sp).

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

Solvente A: solução aquosa de ácido acético (99:1, %v/v); solvente B: 100% de metanol.

Os compostos fenólicos individuais foram quantificados com base da curva de calibração do padrão externo (Apêndices C, D, E, F, G e H), cujos padrões (grau espectrofotométrico) foram dissolvidos em metanol. A concentração das soluções dos padrões variou de 0,125 µg a 12,5 µg.25µL⁻¹ para o ácido p-coumárico, ácido cafeico, quercetina, ácido ferúlico, epicatequina, ácido p-hidroxibenzoico, ácido gálico e para o ácido elágico; de 1,25µg a 87,5 µg.25µL⁻¹ para a catequina; e de 0,125 µg a 6,25 µg.25µL⁻¹ para a miricetina e o kaempferol. Os valores dos pontos de calibração formam estipulados com base em estudos prévios de quantificação de compostos fenólicos individuais em pequenas frutas (SHAHRZAD et al., 1996).

3.2.9 Determinação da capacidade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada através da capacidade dos compostos presentes nas amostras em seqüestrar o radical estável DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Figura 8), seguindo modificação do método citado por Miliauskas et al. (2004). Para a extração dos compostos com atividade antioxidante presentes na amostra, pesou-se cerca de 10 gramas da amostra e homogeneizou-se com 100 mL de metanol (99,5%). O passo da extração foi completado após 2 horas de incubação a temperatura ambiente e na ausência da luz. Os extratos foram filtrados e concentrados em rotaevaporador à 40°C.

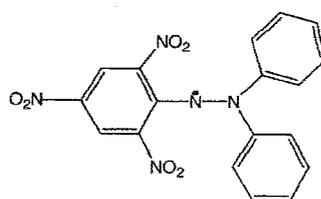


FIGURA 8. Estrutura química do DPPH; e mecanismo simplificado da reação do radical livre DPPH com compostos fenólicos.

Para o ensaio da capacidade antioxidante, a solução do extrato concentrado obtido no rotaevaporador foi preparada dissolvendo-se 0,025g de extrato seco em

10mL de metanol (solução A). A solução de DPPH foi preparada no momento da análise na concentração de $0,025\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ de metanol (solução B). Em seguida adicionou-se 0,5mL da solução A em 0,5mL da solução B, fazendo-se a leitura da absorbância a 517 nm, em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 UV/Visível (Pharmacia Biotech). Após testes prévios foi estipulada em 45 minutos de incubação a temperatura ambiente. Os resultados foram expressos como porcentagem de seqüestro de radicais livres (%SRL), sendo calculada em relação ao decaimento da absorbância das amostras, correlacionando ao decaimento da absorbância do controle (solução B), expressa através da equação 3.

$$\% \text{ inibição (\%SRL)} = [(Ab-Aa)/Ab] \times 100 \quad (\text{eq.3})$$

Onde, Aa: absorção da amostra aos zero minutos de incubação (branco)

Ab: absorção da solução do extrato aos 45 minutos de incubação.

A atividade seqüestrante de radicais livres foi determinada adicionalmente a partir da curva padrão Trolox-DPPH, utilizando-se soluções padrões de 0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; e 3,0 mM, fazendo-se a leitura em espectrofotômetro a 517 nm. No teste, uma alíquota de 5 mL foi retirada de 15 mL do extrato concentrado e adicionados de 5 mL da solução metanólica de DPPH. Para a obtenção do branco utilizou-se de 5 mL de solução metanólica de DPPH. Após 45 minutos fez-se leitura da absorbância, calculando os valores pelo uso da equação obtida da curva de calibração (equação 4).

$$\text{TEAC}_{\text{DPPH relativa}} = [5,0389 \cdot (Ab-Aa) + 0,0643] \cdot m/v \cdot 5 \quad (\text{eq.4})$$

Onde, TEAC= Capacidade antioxidante equivalente a Trolox relativa.

Ab= absorbância do branco

Aa= absorbância da amostra

v= volume do extrato em mL

m= peso da amostra em gramas

Os valores de TEAC foram expressos em μmol de trolox por grama de fruta.

3.2.10 Determinação instrumental da cor

A análise instrumental da cor da amora-preta foi realizada em colorímetro (Minolta CR-300). As amostras dos frutos foram dispostas em placas de Petri com 5 cm de diâmetro e 2 cm de altura. Os parâmetros de cor medidos foram: L^* , a^* e b^* , onde L^* indica a luminosidade (0= preto e 100=branco) e a^* e b^* representam as coordenadas de cromaticidade ($+a^*$ = vermelho, $-a^*$ = verde; $+b^*$ = amarelo, $-b^*$ = azul). Os parâmetros de cor foram convertidos em ângulo de cor, $H^\circ = \tan^{-1}b/a$, indicando o ângulo Hue (H°) da amostra (0° ou 360° = vermelho; 90° = amarelo; 180° = verde; 270° = azul) (ZHANG et al., 2007).

3.2.11 Delineamento estatístico

Os resultados obtidos no estudo foram avaliados pela análise de variância ANOVA, e para os resultados que apresentaram diferença significativa foi aplicado posteriormente o teste de Tukey, ambos ao nível de 5% de probabilidade através do software *Statística 6.0*.(2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Determinações físico-químicas do fruto *in natura* de amora-preta

4.1.1 Caracterização físico-química

Os resultados das análises físico-químicas, relativo à composição nutricional, das cultivares de amora-preta estão apresentados na tabela 5.

TABELA 5. Caracterização físico-química de cultivares de amora-preta (*Rubus* sp).

Determinações	Cultivares		
	Guarani	Tupy	Brazos
Umidade (%)	87,0b±0,8	88,3ab±0,9	89,3a±1,0
Proteína (%)	0,75b±0,7	0,83b±0,4	1,24a±0,5
Cinzas (%)	0,86a±0,4	0,80a±0,2	0,89a±0,3
Fibra (%)	2,02b±0,5	2,52a±0,8	2,05b±0,9
Extrato etéreo (%)	0,17a±0,4	0,15a±0,3	0,14a±0,3
Acidez (% em ácido málico)	1,33a±0,4	0,95c±0,5	1,16b±0,4
Sólidos solúveis (% Brix)	8,5a±0,3	8,5a±0,3	8,6a±0,5
pH	3,15b±0,5	3,28a±0,6	3,27a±0,5
Açúcares totais (% em glicose)	7,10a±1,0	6,96a±0,7	4,09b±0,8
Açúcares redutores (% em glicose)	6,93a±0,3	6,69a±0,5	4,03b±0,6
Açúcares não-redutores (% em sacarose)	0,17a±0,1	0,27a±0,2	0,06b±0,1
Valor calórico (Kcal/100g)	32,93a±2,1	32,51b±2,5	22,58c±1,1

Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão

Letras diferentes na mesma linha mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Pelos resultados se observa que não houve diferença significativa entre as cultivares de amora-preta quanto ao conteúdo de cinzas, extrato etéreo e de sólidos solúveis. Estes resultados confirmam dados de estudos anteriores realizados com as mesmas cultivares de amora-preta, citados por Raseira et al. (2004), e são muito similares aos dados apresentados por Veazie et al. (2002) para as cultivares Arapaho e Navaho.

Observa-se que devido ao alto teor de umidade, a amora-preta apresenta-se como um fruto de difícil conservação na forma *in natura*, por esse motivo é normalmente destinada à produção de polpa, produtos geleificados e sucos naturais (RASEIRA & ANTUNES, 2004). A forma mais eficiente de conservação do fruto na forma *in natura* é com o tratamento em atmosfera controlada, onde pode apresentar uma vida útil de sete dias à 2°C e 90-95% de umidade relativa (VEAZIE, 2002).

O alto teor de fibras presentes no fruto integral das cultivares de amora-preta, quando comparados com teores em frutos em geral, sugere benefícios de sua ingestão em relação ao auxílio nos movimentos peristálticos do trato intestinal. A cultivar Tupy apresentou um conteúdo de fibras significativamente ($p \leq 0,05$) superior às demais cultivares.

A amora-preta apresenta baixas quantidades de proteínas e gorduras, seguindo o mesmo padrão de outros frutos regionais, como o morango, o mirtilo e a framboesa; porém, as cultivares de amora-preta avaliadas apresentam uma quantidade considerável de cinzas, representando o alto conteúdo de minerais presentes no fruto, principalmente pelo alto teor de cálcio (ANTUNES et al., 2002).

O teor de acidez, representado principalmente pela presença do ácido málico, que é o ácido orgânico majoritário nestes frutos (BARBOZA, 1999; KAFKAS, 2006), e o valor do pH, apresentam-se similares aos dados reportados por ANTUNES (2002), MOTA (jul.-set., 2006) e por VEAZIE (2002), o que confere ao fruto um sabor doce-ácido, além de mascarar um pouco a adstringência que acompanha o paladar deste fruto. A diferença significativa de acidez evidencia a diferença das propriedades intrínsecas de cada cultivar, o que está relacionado com a capacidade de síntese de ácidos orgânicos, principalmente dos ácidos não dissociáveis. Esta diferença não foi significativamente evidenciada no valor do pH, o qual consiste em uma medida apenas do total de H^+ ionizáveis presentes nos frutos.

O acúmulo de açúcares, especialmente o alto conteúdo de açúcares redutores (glicose e frutose) é muito importante para os processos fisiológicos, os quais determinam a qualidade do fruto (KAFKAS et al., 2006). Em média, 97% do total de açúcares presentes nos frutos de amora-preta são constituídos por açúcares redutores. As cultivares Guarani e Tupy apresentaram conteúdos similares de açúcares totais, redutores e não redutores; a cultivar Brazos apresentou valores de açúcares significativamente ($p \leq 0,05$) inferiores das demais cultivares.

As cultivares analisadas apresentaram conteúdo de sólidos solúveis considerados adequados na determinação do ponto ideal de colheita do fruto, que deve ficar entre 8-10° Brix, para garantir a manutenção da qualidade do fruto tanto nos aspectos sensoriais como nutricionais (ponto de maturação).

A relação brix/acidez é usada como índice de palatabilidade dos frutos, indica o grau de equilíbrio entre o teor de açúcares e ácidos orgânicos do fruto e está diretamente relacionada à sua qualidade quanto ao atributo sabor, sendo, portanto,

um importante parâmetro a ser considerado para o consumo *in natura*. As cultivares de amora-preta Guarani, Tupy e Brazos apresentaram uma razão de brix/acidez de 6,39; 8,94; e 7,41; respectivamente. Estes resultados são similares aos estudos de Antunes et al. (2003), os quais trabalharam com a conservação pós-colheita de amora-preta das cultivares Brazos e Comanche, obtendo uma relação de brix/acidez de 8,89 e 7,98, respectivamente. Adicionalmente, Mota et al. (2006), estudou sete cultivares de amora-preta, as quais obtiveram uma razão média de 7,58, resultado este muito semelhante ao obtido no presente trabalho.

As cultivares de amora-preta apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) quanto ao valor calórico, ficando na faixa de 22 a 33 Kcal/100g, o que se enquadra pela Legislação vigente como um produto de baixas calorias.

4.1.2 Conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianínicos totais

Os resultados das análises de antocianinas totais e de fenóis totais, nas cultivares de amora-preta, encontram-se na tabela 6.

TABELA 6. Conteúdo total de antocianinas e total de fenóis em amora-preta (*Rubus* sp.) das cultivares Guarani, Tupy e Brazos.

Cultivar	Antocianinas Totais (mg GYD-3-G. 100g ⁻¹)	Fenóis Totais (mg GAE.100g ⁻¹ FW)
Guarani	160,39a±1,0	881,42a±0,9
Tupy	137,59b±1,5	569,89b±0,8
Brazos	61,54c±0,8	862,13a±0,8

Média de três determinações ± estimativa de desvio padrão

Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

GYD-3-G= cianidina-3-glicosídeo; GAE= ácido gálico equivalente; FW= peso fresco.

As antocianinas fazem parte do grupo dos flavonóides, compostos fenólicos que são caracterizados pelo núcleo básico flavílio (cátion 2-fenilbenzopirílico), o qual consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e

condensados por um átomo de oxigênio. A molécula de antocianina é constituída por duas ou três porções, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, freqüentemente, um grupo de ácidos orgânicos (MALACRIDA & MOTTA, 2006). As principais antocianinas citadas em amora-preta são a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo, perfazendo cerca de 80% do total dos compostos antociânicos no fruto (CHIANG & WROLSTAD, 2005; STINTZING et al., 2002).

Com base nos resultados pode-se observar que o teor de antocianinas totais foi significativamente ($p \leq 0,05$) superior na cultivar Guarani, apresentando-se inferior ao resultado ($194,59 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) obtido por Mota (2006) e similar ao resultado ($158,21 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) encontrado por Silva (2007). O teor de antocianinas encontrado na cultivar Tupy ($137,59 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) diferiu significativamente das demais cultivares. Este resultado apresenta-se um pouco superior aos descritos por Mota (2006) e Silva (2007), os quais citam valores de $116,76$ e $104,88 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, respectivamente. Os valores de antocianinas totais encontrados, tanto para a cultivar Guarani quanto para a cultivar Tupy, são semelhantes aos valores médios encontrados em estudos com cultivares como a Choctaw ($125,6 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), Thornless ($146,8 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), Cherokee ($123 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), Marion ($230 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e Navaho ($126 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) (MOYER, 2002; PANTELIDIS et al., 2006; SIRIWOHARN et al., 2004). A cultivar Brazos apresentou um teor de antocianinas total significativamente inferior ($61,54 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) que as demais cultivares, inclusive aos dados reportados por Chiang & Wrolstad (2005) para as cultivares Hull ($75 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e Choctan ($84 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), e por Moyer et al. (2002) para a cultivar obtidas pelo cruzamento entre Cherokee x *R.caucasicus* ($80 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

As diferenças observadas quanto ao conteúdo de antocianinas totais entre as diferentes cultivares pode estar relacionado com as variações genéticas, condições ambientais durante a colheita e também devido à ação enzimática na pós-colheita, principalmente devido a processos oxidativos das polifenoloxidasas, cujo seu principal substrato é a cianidina-3-glicosídeo (BEATTIE et al., 2005; LIMA & GUERRA, 2003).

Muitos compostos fenólicos presentes em frutos e hortaliças são substâncias bioativas, cujas principais classes são representadas pelos flavonoídes, ácidos fenólicos e pelos polifenóis (KING & YOUNG, 1999; GARCIA-ALONSO et al., 2004). A quantificação de compostos fenólicos totais é uma estimativa do conteúdo de

todos os compostos pertencentes às subclasses de compostos fenólicos presentes em uma amostra.

Pelos dados deste estudo observa-se que entre as cultivares Brazos e Guarani não há diferença significativa quanto aos teores de fenóis totais, 862,13 e 881,42 mg GAE.100g⁻¹, respectivamente. Porém, observam-se valores do conteúdo de fenóis totais significativamente inferiores na cultivar Tupy (569,89 mg GAE.100g⁻¹). A similaridade no conteúdo de fenóis totais das cultivares Guarani e Brazos e um conteúdo inferior na cultivar Tupy, foi descrito nos estudos de SILVA (2007).

O conteúdo de fenóis totais presentes nas cultivares Brazos e Guarani assemelham-se aos dados reportados nos estudos de Siriwoharn & Wrolstad (2004) e Siriwoharn et al. (2004), com as cultivares Evergreen (822 mg GAE.100g⁻¹) e Marion (844 mg GAE.100g⁻¹) (KING & YOUNG, 1999; MERKEN, & BEECHER, 2000). O conteúdo de fenóis totais na cultivar Tupy assemelha-se ao conteúdo da cultivar Siskiyou (543 mg GAE.100g⁻¹), apresentando-se um pouco superior ao conteúdo da cultivar Cherokee (407 mg GAE.100g⁻¹), possivelmente devido a similaridade genética e também das condições a que a planta é submetida, já que a síntese de fenóis está relacionada aos fatores de metabolismo de proteção da planta (MOYER et al., 2002).

4.1.3 Conteúdo em ácido L-ascórbico

A determinação do conteúdo de vitaminas específicas em frutos é de extrema importância para o entendimento da relação entre a dieta e a saúde humana (HERNÁNDEZ et al., 2006).

O método de extração e de quantificação de vitamina C em frutos de amora-preta utilizado neste estudo apresentou boa reprodutibilidade dos resultados. O processo de extração da vitamina C dos frutos mostrou-se relativamente simples. A separação cromatográfica, via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com coluna em fase reversa C18 e detector UV-visível a 254 nm, desta vitamina foi eficiente, apresentando o pico bem definido que

representa o ácido L-ascórbico com um tempo de retenção de aproximadamente 3,6 minutos (Figura 9).

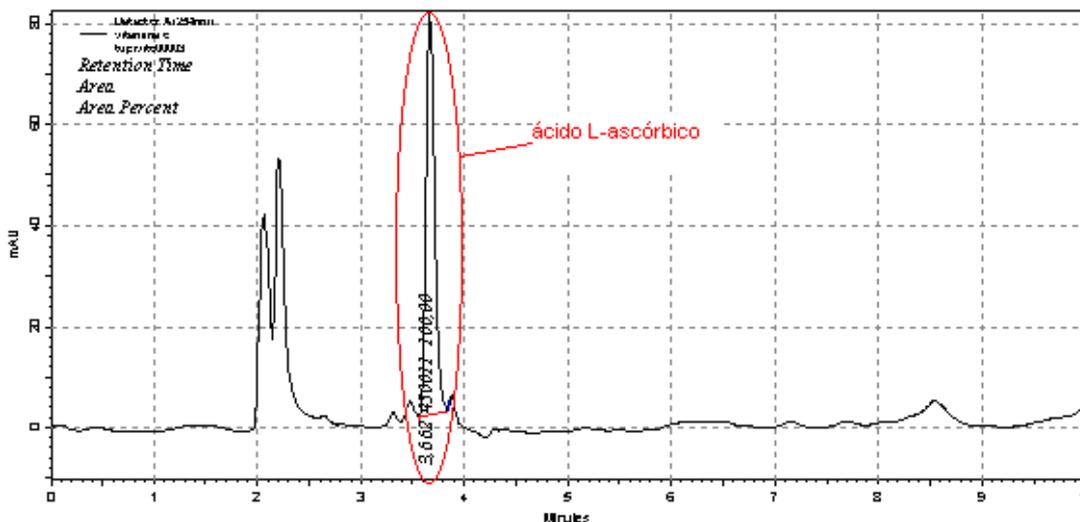


FIGURA 9. Cromatograma típico do ácido L-ascórbico via cromatografia líquida de alta eficiência, com coluna em fase reversa e detector UV (254 nm).

Os resultados desta análise indicam que nos frutos de amora-preta das cultivares avaliadas, e sob as condições em estudo, o teor de vitamina C (Tabela 7) é pouco expressivo. Apesar de ser considerada um fruto rico em compostos com ação antioxidante, não seria indicada como única fonte para suprir as necessidades diárias de vitamina C.

TABELA 7. Conteúdo de ácido L-ascórbico em amora-preta (*Rubus sp*) das cultivares Guarani, Tupy e Brazos.

Cultivar	Ácido L-ascórbico (mg.100g ⁻¹)
Guarani	0,73B±0,2
Tupy	2,49A±0,8
Brazos	0,70B±0,3

Média de Três repetições ± estimativa de desvio padrão

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

As cultivares avaliadas neste estudo apresentaram conteúdos de vitamina C inferiores aos citados na literatura internacional para a amora-preta. Agar et al. (1997) relatam um teor

de vitamina C de 21 mg.100g⁻¹ de fruta fresca e Pantelidis et al. (2008) relatam teores médios de 14 mg.100g⁻¹. Estes resultados podem ser explicados pela forma de quantificação da vitamina C, pois o método cromatográfico quantifica somente a forma mais ativa, o ácido L-ascórbico (AA), e não mensura as outras formas químicas de compostos, isômeros e formas oxidadas, que representam a vitamina C.

O conteúdo de vitamina C na cultivar Tupy se diferencia significativamente ($p \leq 0,05$) do conteúdo das cultivares Guarani e Brazos, apresentando o maior conteúdo de ácido L-ascórbico (2,49 mg.100g⁻¹).

4.1.4 Conteúdo de tocoferóis

Frutas e hortaliças contém vitamina C, vitamina E (tocoferóis), compostos fenólicos e carotenóides, os quais constituem um importante grupo de compostos bioativos presentes em plantas. Recentemente, a avaliação da composição destes constituintes em alimentos vem adquirindo importância, devido as suas alegações de proteção a uma série de doenças.

A figura 10 representa o cromatograma típico de separação e identificação de tocoferóis em cultivares de amora preta, no qual pode-se verificar que o método foi satisfatório para a separação e identificação de três picos, correspondentes aos tocoferóis presentes na amostra, apresentado picos assimétricos e sem interferentes que poderiam falsear o resultado. O pico inicial compreende a determinação simultânea de β - e δ -tocoferol, pois no tipo de coluna utilizada (fase reversa) não é possível a separação destes dois compostos.

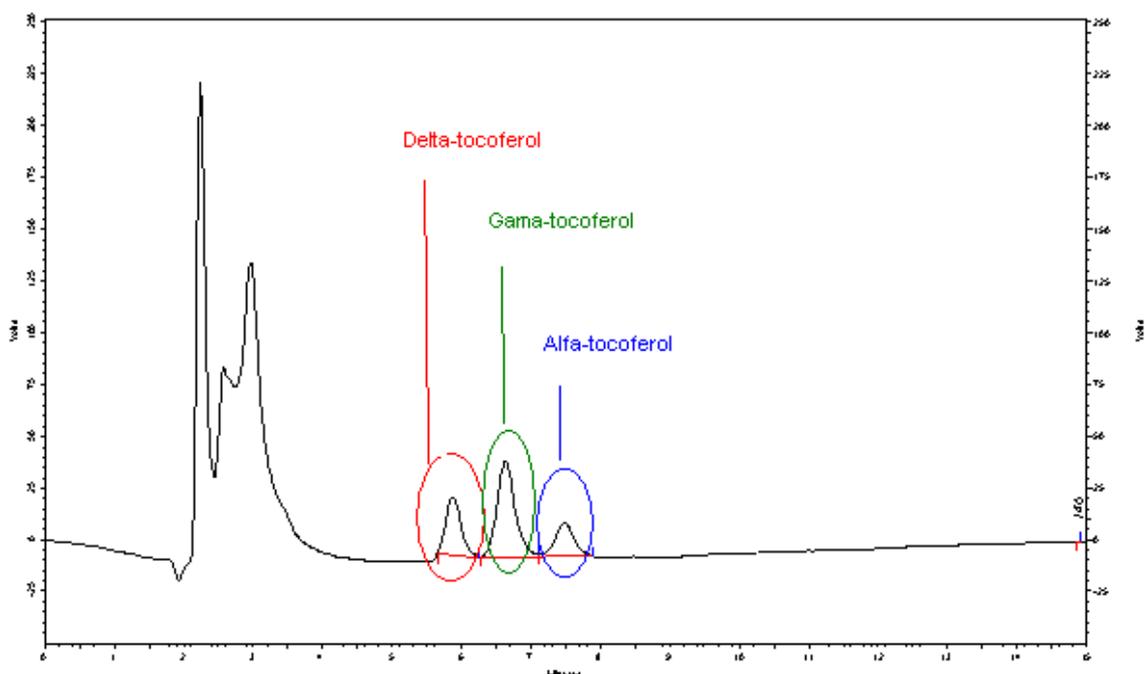


FIGURA 10. Cromatograma típico da separação dos tocoferóis em amora-preta (*Rubus* sp) cv. Tupy, por HPLC, com coluna de fase reversa e detector de fluorescência a 290 nm de excitação e de 330nm de emissão.

Na tabela 8 estão expostos os dados referentes à soma total dos dados quantificados em cada um dos picos correspondentes aos diferentes tocoferóis presentes na amostra. A quantificação foi expressa em mg de tocoferóis por 100g de amostra.

TABELA 8. Conteúdo de tocoferóis (mg.100g⁻¹ de amostra) presentes nas cultivares de amora-preta (*Rubus* sp).

Cultivar	Tocopheróis(mg.100g ⁻¹)
Guarani	0,468A±0,2
Tupy	0,168B±0,8
Brazos	0,537A±0,3

Média de Três repetições ± estimativa de desvio padrão

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

Segundo os dados expostos na tabela 8 verifica-se que o conteúdo de tocoferóis (vitamina E) em frutos de amora-preta são relativamente baixas, assim

como verificado com o conteúdo de vitamina C (na forma de ácido L-ascórbico). As cultivares Guarani e Brazos não diferiram entre si quanto ao conteúdo de tocoferóis, porém apresentaram um conteúdo significativamente superior ao da cultivar Tupy.

O conteúdo de tocoferóis apresentado na cultivar Tupy, assemelha-se aos dados reportados para outras frutas nos estudos de Kim et al. (2007), os quais avaliaram o conteúdo de tocoferóis em pêssego ($0,140 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e uva ($0,120 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$); e em estudos de Chum et al. (2006), que reportaram um conteúdo de tocoferóis de $0,580 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ em mirtilo. As cultivares Guarani e Brazos apresentaram quantidades de tocoferóis semelhantes, porém em quantidades significativamente inferiores aos dados dos estudos realizados por Chum et al. (2006) para o fruto de amora-preta, os quais reportaram quantidades em torno de $1,43 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$.

4.1.5 Conteúdo individual de ácidos fenólicos e de flavanols

Os ácidos fenólicos são os principais compostos que fazem parte do grupo de compostos fenólicos, que são responsáveis pelo metabolismo secundário de plantas, estando vinculados à formação de compostos derivados e em reações químicas e biológicas na planta, sendo os principais derivados do ácido cinâmico e do ácido benzóico (SIMÕES et al., 2007).

A figura 11 exemplifica o cromatograma típico de separação dos ácidos fenólicos e flavanols presentes em cultivares de amora-preta.

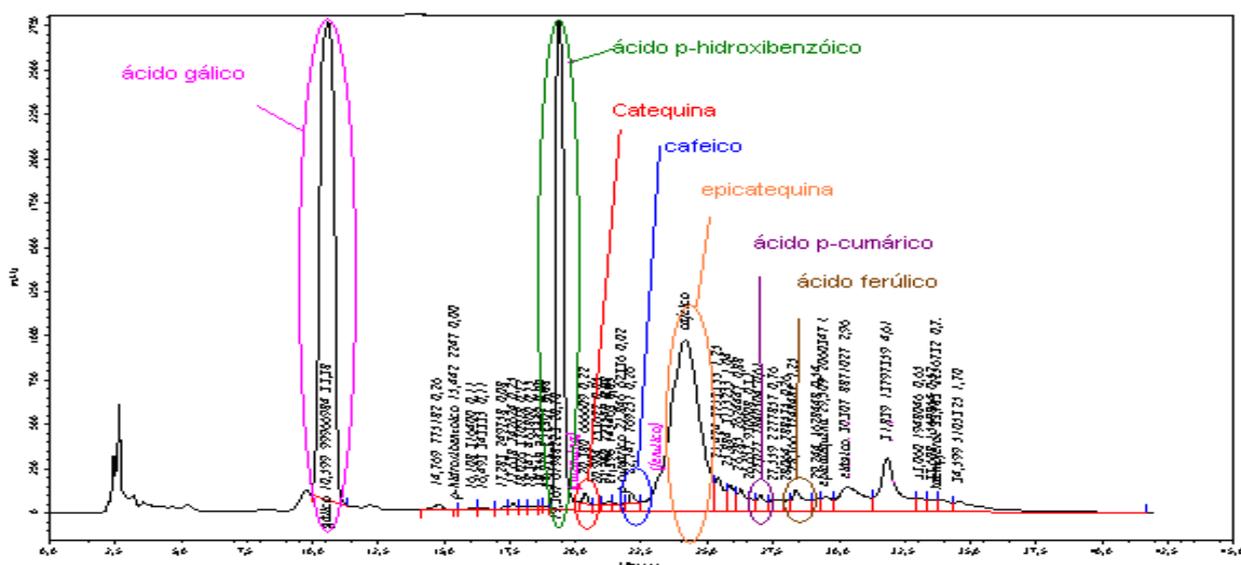


FIGURA 11. Cromatograma típico da separação de ácidos fenólicos e flavanols em amora-preta (*Rubus* sp) via HPLC, com coluna de fase reversa C18 e detector UV a 280 nm.

A metodologia de separação e quantificação dos compostos fenólicos foi estabelecida para o presente trabalho, com base em testes de extração e condições cromatográficas preliminares, utilizando como base, os métodos descritos nos trabalhos de HÄKKINEN et al. (1998) e ZAMBIAZI (1997), passando por hidrólise ácida. Inicialmente testou-se a extração dos compostos fenólicos utilizando-se uma mistura de água ultra pura: metanol (1:1,6, v/v) acidificada com ácido clorídrico 6M; porém, apesar das reproduções, não se obteve bons resultados de recuperação dos ácidos fenólicos e flavanols na amostra, pois devido a presença de água despendia-se mais tempo no momento da evaporação, ocasionando perdas destes compostos.

Uma pequena adaptação da metodologia apresentou melhores resultados e reprodutibilidade. Eliminou-se a adição da água no processo de extração, utilizando-se apenas metanol acidificado com ácido clorídrico 6M. Assim, obteve-se uma redução no tempo de evaporação no rotaevaporador, ocasionando menor variabilidade no conteúdo de compostos fenólicos.

Foram realizados ainda vários testes para a definição das condições cromatográficas. Em um primeiro momento testou-se três fases móveis para a separação dos compostos fenólicos em coluna de fase reversa, incluindo as soluções de 1% de ácido fórmico em água, 100% de metanol e 1% de ácido fórmico em água: metanol (70:30, v/v), com um sistema de gradiente de eluição e fluxo de

0,9 mL/min. Porém, apesar das alterações no gradiente de eluição, onde alterou-se a proporção das fases móveis a pressão no equipamento tornava-se muito alta (acima de 250 Kgf/cm²), impossibilitando assim a realização da análise. Para tanto, modificou-se a composição da fase móvel, utilizando-se um gradiente de eluição apenas com metanol e a solução de 1% de ácido acético em água ultra pura, e reduziu-se o fluxo da fase móvel para 0,8mL/min. Com estas alterações conseguiu-se uma boa separação dos ácidos fenólicos e flavanols, aliada a menores pressões de trabalho no sistema.

Pelo cromatograma, observam-se a presença de nove picos representativos de ácidos fenólicos e flavanols (Tabela 9), presentes em todas as cultivares analisadas. Destes, sete picos foram identificados com auxílio de padrões cromatográficos, os demais picos não puderam ser identificados, devido à falta de padrões específicos que coincidissem com os tempos de retenção destes compostos.

TABELA 9. Compostos fenólicos majoritários (em mg. 100g⁻¹ em ácido gálico) presentes nas cultivares de amora-preta (*Rubus* sp).

Composto fenólico	Cultivar		
	Guarani	Tupy	Brazos
Ácido gálico	159,69a±1,5	151,44b±1,6	124,18c±2,0
Ácido p-hidroxibenzóico	45,83c±1,0	124,38a±2,5	88,43b±1,2
Catequina	9,19a±0,8	3,03c±0,5	7,27b±0,8
Ácido p-cumárico	nd	0,16b±0,9	0,23a±0,7
Ácido ferúlico	nd	1,04b±1,1	2,42a±0,7
Ácido cafeico	2,67a±0,6	0,73c±0,05	2,02b±0,5
Epicatequina	32,03c±0,9	67,89a±1,5	56,75b±1,6
Ácido elágico	7,05b±1,5	11,57a±0,8	7,95b±0,7
Quercetina	8,66	nd	nd

Média de três determinações ± estimativa de desvio padrão

Letras minúsculas diferentes na mesma linha mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

nd= não detectado

A soma do conteúdo dos ácidos fenólicos e flavanols individuais quantificados via cromatografia perfazem cerca de 30 a 60% do total de compostos fenólicos presentes em cultivares de amora-preta (Tabela 6). O restante dos compostos fenólicos é devido à presença de polímeros fenólicos e de outros componentes presentes em suas subclasses, os quais também são quantificados na determinação do conteúdo total de fenóis da amostra, mas não são quantificados como ácidos fenólicos e flavanols.

Os principais compostos fenólicos identificados nas cultivares de amora-preta, são os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico e epicatequina, os quais representam, em média, 60, 31 e 27% da soma do conteúdo dos ácidos fenólicos identificados (Tabela 9), para as cultivares Guarani, Tupy e Brazos, respectivamente.

O ácido gálico apresenta-se como o ácido fenólico majoritário em todas as cultivares de amora-preta, representando no total de ácidos fenólicos para as cultivares Guarani, Tupy e Brazos, respectivamente, 60%, 42% e 43%. Este composto fenólico representa também importante papel no conteúdo de fenóis totais perfazendo 18%, 26,5% e 14,4% (Tabela 6), para as cv. Guarani, Tupy e Brazos, respectivamente. Estes resultados confirmam dados da literatura que reportam o ácido gálico como sendo o componente de maior expressão na quantificação de fenóis totais em amora-preta (SINGLETON & ROSSI, 1996).

O conteúdo dos ácidos fenólicos individuais identificados apresentam diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$) nas cultivares analisadas. A cultivar Guarani apresenta os teores mais baixos de ácido p-hidroxibenzóico e epicatequina, no entanto foi a única cultivar que apresentou a quercetina.

Os dados de quantificação de compostos fenólicos individuais em cultivares nacionais são ainda pouco explorados. Sellappan et al. (2002), analisando cultivares de amora-preta Choctaw e Kiowa, reportaram os ácidos gálico e o ácido cafeico como os ácidos majoritários, com 6,42 a 4,12 $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ e 1,38 a 3,64 $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, respectivamente; porém, as amostras não passaram por uma hidrólise no processo de extração.

Comparativamente, as cultivares analisadas no presente estudo apresentaram quantidades significativamente superiores de ácidos fenólicos que as cultivares americanas, devido possivelmente às condições pré-colheita que influenciam na biossíntese dos fitoquímicos. Zadernowski et al. (2005) identificaram em amora-preta, sem especificação das cultivares, conteúdos de ácidos fenólicos

consideravelmente inferiores, de 8,9 mg.100g⁻¹ de ácido gálico e 10,55 mg.100g⁻¹ de ácido cafeico.

As discrepâncias entre os diferentes estudos podem ser devido às diferenças entre as cultivares e regiões geográficas de cultivo, ou ainda devido a diferenças metodológicas. O grau superior de remoção dos compostos fenólicos da amostra durante o processo de extração, pode ter interferido na maior quantidade de ácidos fenólicos presentes nas cultivares analisadas neste estudo.

4.1.6. Determinação da capacidade antioxidante

Os resultados da análise da atividade antioxidante em extratos das três cultivares de amora-preta, encontram-se na tabela 10.

TABELA 10. Valores da capacidade antioxidante (DPPH e TEAC) em extratos de amora-preta (*Rubus* sp.), das cultivares Guarani, Tupy e Brazos.

Cultivar	DPPH (% inibição)	TEAC relativa- DPPH ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ TE)
Guarani	86,92a \pm 0,5	14,88a \pm 0,6
Tupy	87,73a \pm 0,4	15,21a \pm 0,6
Brazos	83,14b \pm 0,6	14,05b \pm 0,7

Média de três determinações \pm estimativa de desvio padrão

Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

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

A capacidade antioxidante de frutos e vegetais vem sendo reportada na literatura pela relação direta do conteúdo total de fenóis e de antocianinas presentes no material. Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que apresentam atividade antioxidante, e, portanto, possuem a capacidade de retardar a velocidade de reações oxidativas, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e por complexação de metais (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Segundo KUSKOSKI et al. (2005), a capacidade antioxidativa de um determinado fruto é resultante da interação de seus componentes, os quais propiciam um microambiente específico, podendo produzir-se efeitos sinérgicos ou inibitórios.

Uma maneira de avaliar a capacidade antioxidativa dos frutos é através do método de DPPH, que mede a capacidade do radical livre (1,1-difenil-2-

picrilhidrazila) de reagir com compostos antioxidantes presentes em uma amostra, para formar o DPPH- H estável, obtido pela doação de um átomo de hidrogênio para o radical livre.

Os testes de DPPH realizados neste estudo demonstram que os extratos das cultivares Guarani e Tupy apresentaram os maiores valores de capacidade antioxidante, não apresentando diferenças significativas entre si, apresentando 86,92% (14,88 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ TE) e 87,73% de inibição de radicais livres (15,21 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ TE), respectivamente. Porém, observa-se que os extratos da cultivar Brazos apresentaram valores (83,14% de inibição, 14,05 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ TE) significativamente inferiores ($p \leq 0,05$) aos extratos das demais cultivares estudadas. Os resultados deste estudo são similares ao apresentado no estudo de Kuskoski et al. (2005) em frutos de amora-preta, os quais relatam 82,6% de inibição. Silva (2007) cita para as cultivares de amora-preta Guarani, Tupy e Brazos, 12,03; 9,89; e 11,48 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ TE, respectivamente.

Uma alta correlação positiva (R^2 : 0,9255) (Figura 12) pode ser observada entre os dados da capacidade antioxidante pelo método do DPPH ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ TE) e do conteúdo de antocianinas totais nas cultivares de amora-preta estudadas.

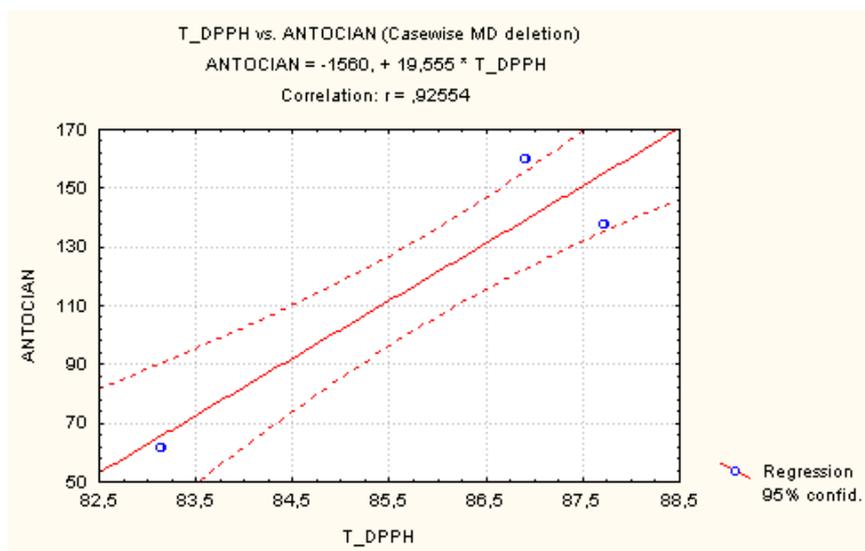


FIGURA 12. Correlação entre o conteúdo de antocianinas totais e a capacidade antioxidante da amora-preta (*Rubus* sp) das cultivares Guarani, Tupy e Brazos.

No entanto, não se observa a mesma correlação com relação entre o conteúdo de fenóis totais e a capacidade antioxidante (R^2 : -0,5890) (Figura 13).

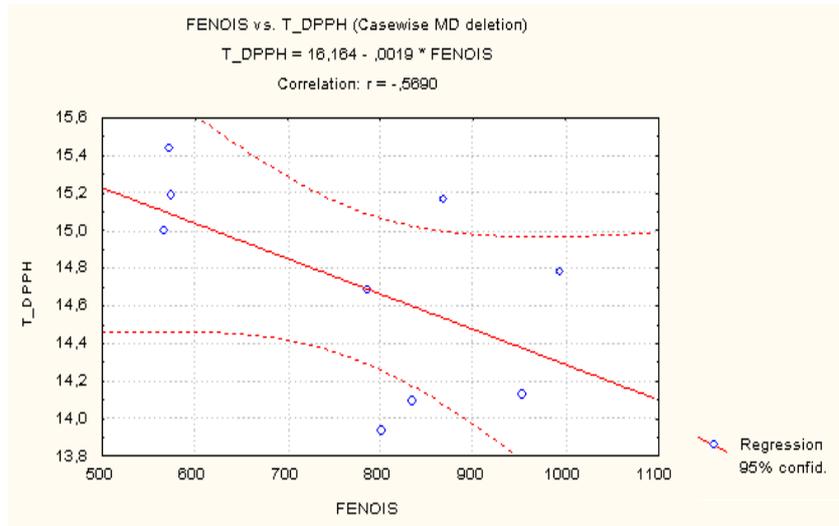


FIGURA 13. Correlação entre o conteúdo de fenóis totais e a capacidade antioxidante da amora-preta (*Rubus* sp) das cultivares Guarani, Tupy e Brazos.

Pelos resultados, mesmo havendo uma correlação positiva, não se observa uma forte relação entre o conteúdo de antocianinas totais e da capacidade antioxidante, pois a cultivar Guarani apresentou um teor de antocianinas totais significativamente superior ao teor presente na cultivar Tupy, mas a capacidade antioxidante de ambas as cultivares foi praticamente a mesma. Com base nestes dados, pode-se inferir que a capacidade antioxidante não é regida por uma única classe de compostos ou por um único composto específico, mas provavelmente devido a um sinergismo entre os diferentes compostos presentes no meio.

Os tocoferóis também são compostos naturais que possuem uma possível ação antioxidante, mas pelos dados da tabela 8, observa-se que a cultivar Tupy apresenta um conteúdo de tocoferóis significativamente inferior ao conteúdo das demais cultivares, o que também não justificaria sua capacidade antioxidativa superior.

No entanto, a cultivar Tupy apresentou, em relação as outras cultivares, conteúdos superiores de vitamina C (embora presente em pequena quantidade), do ácido p-hidrobencóico, do ácido cafeico, do ácido elágico e de epicatequina, e um alto conteúdo do ácido gálico. Segundo Duarte-Almeida (2006), dentre os ácidos fenólicos presentes na amora-preta, o ácido gálico e o ácido elágico são considerados os principais responsáveis pela capacidade antioxidante, apresentando 41% e 34% de inibição dos radicais livres, respectivamente.

Com isto, não se observa uma relação direta da capacidade antioxidante apenas com o conteúdo de antocianinas e compostos fenólicos totais presentes na amora-preta, mas que haja provavelmente uma relação com o conteúdo de vitamina C, com o tipo específico de um determinado composto fenólico, e mesmo pela interação entre diferentes compostos presentes no meio.

4.1.7 Avaliação instrumental da cor

A cor é um parâmetro crítico de qualidade, e a sua determinação é muito útil para correlacionar com a concentração de pigmentos presentes no fruto. Métodos de quantificação de antocianinas totais e índices de cor vêm sendo estabelecidos e utilizados em aplicações de controle industrial (NGO et al., 2007).

A diferença de cores entre as cultivares de amora-preta analisadas neste estudo pode ser observada visualmente (Figura 14).



FIGURA 14. Cultivares de amora-preta (*Rubus* sp), colhidas em novembro-dezembro de 2005, na estação experimental Embrapa Clima Temperado.

Os dados referentes à análise instrumental de cor nas cultivares Guarani, Tupy e Brazos, encontram-se na tabela 11.

TABELA 11. Valores dos ângulos de cor, luminosidade (L) e coordenadas de cromaticidade a* e b* de amora-preta (*Rubus* sp) cultivares Guarani, Tupy e Brazos.

Cultivares	H° (ângulo Hue)	L	a*	b*
Guarani	-29,16A±0,8	76,11C±1,5	54,67A±0,8	-30,53A±0,9
Tupy	-27,35B±1,1	108,37A±2,2	41,25C±0,7	-21,31C±0,6
Brazos	-25,89C±0,9	104,90B±2,1	45,75B±1,2	-22,21B±0,8

Média de Três repetições ± estimativa de desvio-padrão

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna evidenciam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Observa-se que em relação aos valores das coordenadas e ângulo de cor, todas as cultivares diferenciaram-se significativamente entre si ($p \leq 0,05$). A cultivar Guarani apresentou a cor mais próxima dos tons mais intensos de azul e vermelho, com menor luminosidade; representando, portanto, a cultivar com coloração mais escura (Figura 15).

As cultivares Brazos e Tupy apresentaram valores de luminosidade mais próximos do branco, sendo caracterizadas como frutas mais claras. Os valores de a* e b* foram mais próximos dos extremos inferiores de vermelho e azul, representando tonalidades menos intensas, porém diferenciaram-se significativamente entre si. A cultivar Tupy apresentou cor mais clara, com os menores valores das coordenadas a* (vermelho) e b* (azul).

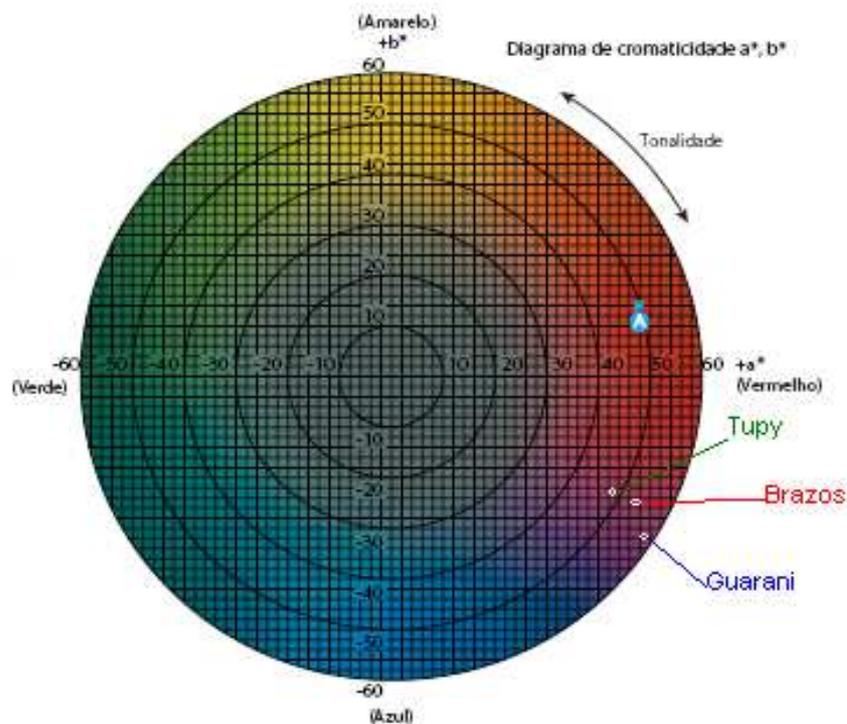


FIGURA 15. Representação gráfica dos valores de L, a* e b* obtidos em colorímetro Minolta CR-300, para amora-preta (*Rubus sp*) das cultivares Guarani, Tupy e Brazos.

As antocianinas são os principais pigmentos presentes na amora-preta, no entanto, estes pigmentos são muito instáveis, podendo ser destruídos por diversos fatores, como pela presença de oxigênio, da temperatura, do pH do meio e do teor de ácido ascórbico. Destes fatores o que mais afeta a cor da maioria das antocianinas em solução é o potencial hidrogeniônico (pH), devido ao equilíbrio das diferentes formas estruturais, apresentando coloração avermelhada em pH ácido (1-2), azulada em pH intermediário (4) e incolor em pH alcalino (LIMA & GUERRA, 2003; NIELSEN et al., 2003). A cultivar Guarani apresentou o valor do pH significativamente ($p \leq 0,05$) inferior (3,15) que as demais cultivares, as quais, não apresentam diferenças significativas entre si, coincidindo com o maior conteúdo de antocianinas totais.

A correlação entre o teor de antocianinas totais e o ângulo de cor formado, esta apresentado na figura 16.

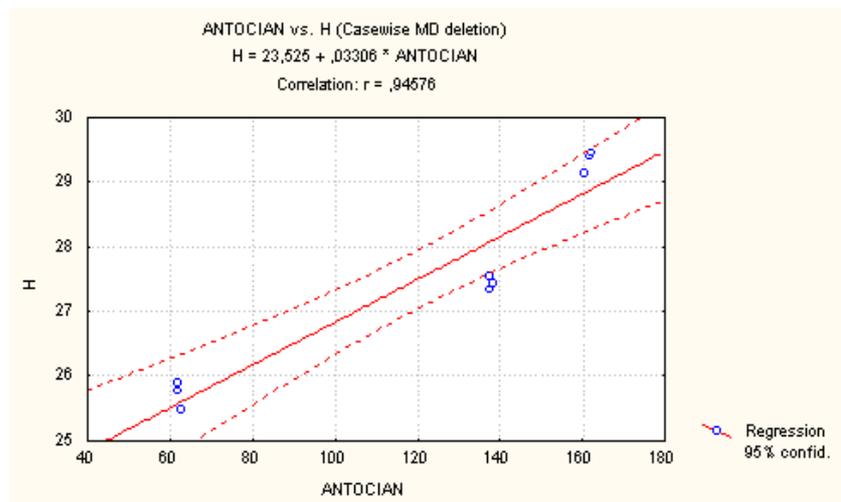


FIGURA 16. Correlação entre o conteúdo de antocianinas totais e ângulo Hue em amora-preta (*Rubus* sp) de cultivares Guarani, Tupy e Brazos.

Observou-se uma correlação significativamente positiva entre o conteúdo total de antocianinas e o ângulo Hue (H°) formado pelas coordenadas de cromaticidade ($R^2 = 0,9458$), indicando que ocorreu uma relação diretamente proporcional entre o conteúdo de antocianinas totais e a intensidade da cor para as três cultivares de amora-preta.

4.2 Determinações físico-químicas das geléias de amora-preta

Baseado nos resultados das análises físico-químicas, optou-se pela cultivar Tupy, para ser utilizada como matéria-prima para o processamento das geléias, por apresentar similaridade na composição físico-química, teores superiores de compostos fenólicos individuais identificados e também, pelo maior conteúdo em vitamina C. Assim, pode-se avaliar com maior facilidade a taxa de retenção destes compostos bioativos, os quais são considerados responsáveis pela atividade antioxidante da amora-preta, no processamento e armazenamento de geléias convencional e *light* de amora-preta.

4.2.1 Caracterização físico-química

Na tabela 12 estão expostos os dados referentes às determinações físico-químicas das geléias, convencional e *light*, de amora-preta da cultivar Tupy, logo após processadas.

TABELA 12. Caracterização físico-química das geléias convencional e *light* de amora-preta (*Rubus sp*) cv. Tupy.

Determinação	Geléia	
	Convencional	<i>Light</i>
Umidade (%)	27,38b±0,9	55,67a±1,1
Proteína (%)	0,63a±0,6	0,87a±0,7
Cinzas (%)	0,35b±0,5	0,47a±0,4
Fibra (%)	2,63a±0,7	3,25a±0,9
Extrato etéreo (%)	0,45a±0,6	0,60a±0,5
Acidez (% em ácido málico)	0,99a±0,4	0,99a±0,5
Sólidos solúveis (% Brix)	68,4a±1,2	43,0b±1,5
pH	3,07a±0,7	3,11a±0,7
Açúcares totais (% em glicose)	58,82a±1,3	35,83b±1,6
Açúcares redutores (% em glicose)	32,97a±1,1	19,38b±1,5
Açúcares não-redutores (% em sacarose)	25,83a±0,6	16,38b±0,9
Valor calórico (Kcal/100g)	241,90a±2,5	151,93b±2,6

Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão

Letras minúsculas diferentes na mesma linha mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Pode-se verificar que ocorreu uma variação significativa entre a geléia convencional e a geléia *light* com relação aos teores de umidade, cinzas, sólidos solúveis totais, açúcares totais, açúcares redutores, açúcares não redutores e do valor calórico. Como esperado, o maior teor de umidade na geléia *light* se deve ao menor tempo de processamento, e conseqüentemente, menor evaporação de água. O menor conteúdo de sólidos totais e de açúcares totais ocorreu pela redução do conteúdo de sacarose utilizado para a elaboração da formulação *light*. O maior conteúdo de cinzas pode estar relacionado pela incorporação de cloreto de cálcio na formulação *light*, o qual é utilizado como coadjuvante no processo de geleificação.

Os valores obtidos nas determinações de pH, proteínas, fibras, extrato etéreo e de acidez, apresentaram-se similares aos dados reportados em estudos realizados por Mota (2006) e Nachtigall et al. (2004), no fruto *in natura* e em geléia convencional e *light* de amora-preta da cultivar Tupy.

Na formulação de geléia com baixo valor calórico, adicionou-se apenas 50% da quantidade de sacarose adicionada na formulação convencional, resultando em uma redução aproximada de 37% no seu conteúdo calórico. Este produto, portanto, atende ao regulamento técnico da Anvisa (BRASIL, 1998) referente à informação nutricional complementar, que preconiza 25% como o mínimo de redução calórica para que a geléia seja considerada *light*.

4.2.2 Conteúdo de compostos fenólicos e antocianínicos totais

Na tabela 13 estão expostos os valores das determinações do conteúdo total de fenóis e do conteúdo total de antocianinas das geléias de amora-preta cv. Tupy, logo após o processamento e durante o armazenamento de seis meses a temperatura ambiente.

TABELA 13. Conteúdo total de antocianinas e de fenóis em geléias de amora-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy, durante o período de armazenamento.

Determinações	Tempo de armazenamento (meses)	Geléia	
		Convencional	Light
Antocianinas totais (mg GYD-3-G. 100g ⁻¹)	0	31,29Ba±0,8	50,52Aa±1,2
	2	12,07Bb±0,5	18,62 Ab±0,6
	4	7,61Bc±1,1	10,29Ac±1,2
	6	4,22Bd±0,5	6,75 Ad±0,7
	0	1048,08Ba±2,1	1148,8Aa±2,0
Fenóis totais (mg GAE.100g ⁻¹ FW)	2	1028,00Bb±1,5	1129,70Ab±1,7
	4	809,90Bc±1,0	853,79 Ac±1,2
	6	583,05Bd±2,5	746,49 Ad±2,1

Média de três determinações ± estimativa de desvio padrão

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para a mesma geléia entre os tempos de armazenamento.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre as diferentes geléias no mesmo tempo de armazenamento.

GYD-3-G= cianidina-3-glicosídeo; GAE= ácido gálico equivalente; FW= peso fresco;

Comparando-se os teores de antocianinas totais da amora-preta cv. Tupy na forma *in natura* (137,59 mg GYD-3-G. 100g⁻¹, Tabela 6) e os valores determinados nas geléias processadas a partir desta fruta (Tabela 13), observa-se que as condições de processamento neste estudo influenciaram em uma redução do teor inicial destes pigmentos, tanto na geléia convencional quanto na geléia *light*. No entanto, a perda destes pigmentos foi mais pronunciada na geléia convencional, a qual apresentou uma redução de 77% em base úmida e 93,7% em base seca, em relação ao conteúdo de antocianinas na fruta *in natura*, enquanto que na formulação *light* a redução foi de 63% em base úmida e de 86,97% em base seca.

A menor taxa de degradação do total dos compostos antociânicos na geléia *light*, possivelmente ocorre porque durante o processamento deste tipo de produto ocorre uma menor exposição a altas temperaturas (105°C), por ser o calor um dos principais fatores destrutivos das antocianinas. Assim, a exposição do produto no menor espaço de tempo a altas temperaturas é o recomendado para uma maior retenção das antocianinas presentes nos alimentos (WROLSTAD & SKREDE, 2002).

Ao longo do armazenamento observa-se um decréscimo significativo do conteúdo de antocianinas totais, tanto na geléia convencional quanto na *light*, concordando com os estudos em geléias de sete cultivares de amora-preta convencional realizados por Mota (2006), que observou uma redução média de 57%

no conteúdo inicial de antocianinas totais, ao longo de 90 dias de armazenamento a temperatura ambiente. O decréscimo no conteúdo destes pigmentos durante o período de armazenamento pode ser devido a presença de oxigênio no interior da embalagem, o que pode ocasionar reações oxidativas, as quais podem gerar produtos instáveis oriundos das antocianinas, ocorrendo assim perda de coloração (WROLSTAD & SKREDE, 2002). Ao final dos seis meses de armazenamento, a taxa de degradação de antocianinas nas geléias *light* representou cerca de 2% a menos que a geléia convencional. Observa-se um conteúdo superior de fenóis totais nas geléias (Tabela 13), quando comparado ao teor inicial na polpa do fruto (569,89 mg GAE.100g⁻¹FW, Tabela 6). No entanto, ao calcular-se em termos de base seca, observa-se que na geléia convencional ocorre uma perda de 51,0% dos fenóis totais e uma perda de apenas 29,5% dos fenóis totais na geléia *light*, representando que as perdas foram significativamente inferiores na geléia *light*, possivelmente devido ao menor tempo de exposição destes compostos a altas temperaturas (105°C).

Observa-se uma redução significativa no conteúdo de fenóis totais durante o período de armazenamento, tanto na geléia convencional quanto na geléia *light*. Presume-se que estas perdas estejam relacionadas a presença da luz e as reações oxidativas, já que as geléias permaneceram estocadas na temperatura ambiente.

Ao final de seis meses de armazenamento a temperatura ambiente, observou-se uma redução de 44,5% no conteúdo de fenóis totais para a geléia convencional e de uma redução de 35% na geléia *light*. A redução no conteúdo de fenóis totais também foi reportada em estudos realizados por Häkkinen et al. (2000) em geléias produzidas por frutas dos gêneros *Rosaceae* e *Rubus* durante o período de nove meses de armazenamento.

As perdas de antocianinas totais durante o período de armazenamento foram similares para as geléias convencional e *light*, representando perdas de 86,5%, em ambas as geléias, após seis meses de estocagem. Porém, a degradação de fenóis totais foi inferior do que o decréscimo no conteúdo de antocianinas totais durante o armazenamento, onde a geléia convencional apresentou perdas de 43,3% e a geléia *light* apresentou uma perda de apenas 34,0% de fenóis totais em seis meses de armazenamento. Portanto, os compostos que fazem parte do conteúdo total de fenóis mostraram-se mais estáveis que as antocianinas, tanto durante o processamento quanto durante o período de estocagem das geléias, principalmente nas geléias *light*.

4.2.3 Conteúdo em ácido L-ascórbico

A vitamina C é uma das vitaminas mais instáveis, e sua presença é fortemente afetada pelas condições do processamento, manuseio e do armazenamento de alimentos (WONG, 1995).

A figura 17 representa um cromatograma típico de quantificação de ácido L-ascórbico (vitamina C) em geléias durante o armazenamento a temperatura ambiente.

Comparando a figura 9 (cromatograma de quantificação da do ácido L-ascórbico da polpa do fruto *in natura*) com a figura 17, observa-se que na análise da polpa ocorre uma melhor definição do pico que corresponde à vitamina C. Na análise das geléias, o pico correspondente à vitamina C apresenta-se mais arredondado, provavelmente devido à pequena quantidade desta vitamina presente na amostra. No entanto, a eficiência da separação não afetou no tempo de retenção desta vitamina.

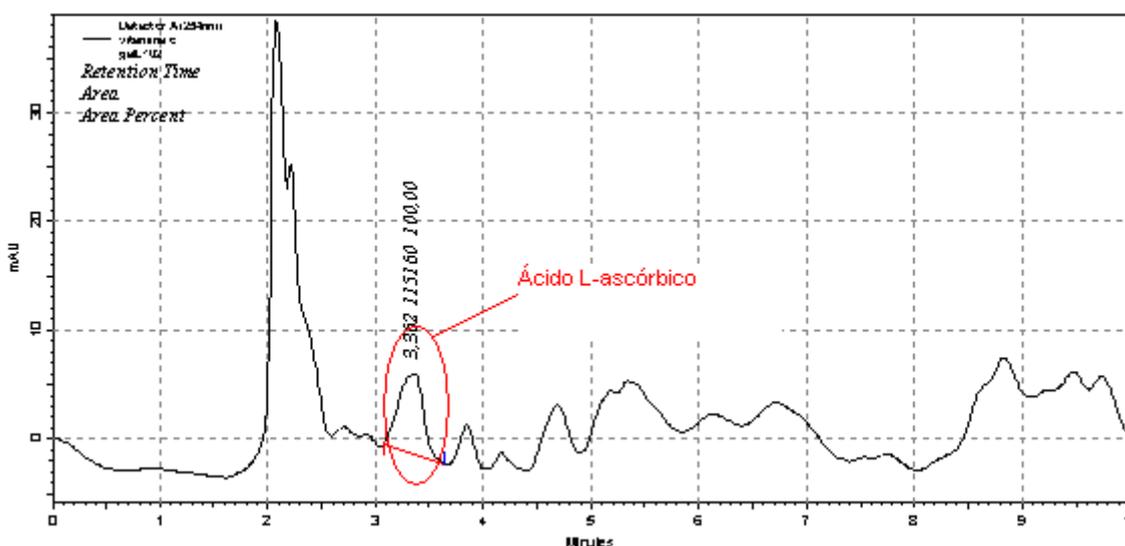


FIGURA 17. Cromatograma típico de quantificação de ácido L-ascórbico em geléia *light* de amora-preta cv. Tupy.

Pelos dados do conteúdo de ácido L-ascórbico na polpa *in natura* (Tabela 7) e nas geléias convencional e *light* (Tabela 14), observa-se uma perda considerável de ácido L-ascórbico durante o processamento. A redução no teor de ácido L-ascórbico

presente na formulação da geléia convencional foi de 88,3% em base úmida e de 96,8% em base seca, e de 84,6% em base úmida e de 94,5% em base seca na geléia *light*, quando comparados aos teores presentes na polpa *in natura* de amora-preta.

TABELA 14. Conteúdo de ácido L-ascórbico (mg.100g⁻¹) em geléias convencional e *light* de amora-preta (*Rubus* sp) cv. Tupy, no período de armazenamento.

Geléia	Tempo de armazenamento (meses)			
	0	2	4	6
Convencional	0,290Ba±0,02	0,170Bb±0,05	0,013Bc±0,01	nd
Light	0,382Aa±0,05	0,227Ab±0,02	0,133Ac±0,04	nd

Média de três determinações ± estimativa de desvio padrão

Letras minúsculas diferentes na mesma linha mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para a mesma geléia entre os tempos de armazenamento.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre os tipos de geléias no mesmo tempo de armazenamento.

nd= não detectado

A redução no conteúdo de ácido L-ascórbico foi observada também durante o período de armazenamento. Até aos dois meses de estocagem observa-se uma taxa de degradação semelhante da vitamina C presente na geléia convencional (redução de 41,3%) e na geléia *light* (redução de 40,5%). O percentual de perdas desta vitamina aos quatro meses de armazenamento foi significativamente superior na geléia convencional (95,5%) quando comparada com as perdas ocorridas na geléia *light* (65,2%). No entanto, ao final de seis meses de armazenamento não foi possível detectar a presença do ácido L-ascórbico tanto na geléia convencional como na geléia *light*.

As perdas de vitamina C ocorridas durante a estocagem, já foram reportados em trabalhos como os de Yamashita et al. (2003), os quais estudaram diferentes produtos de acerola, e encontraram perdas durante o armazenamento a temperatura ambiente durante o período de seis meses, de até 90% do conteúdo total da vitamina C. Giannakourou & Taoukis (2003) também relatam perdas de 1,4 a 75% dessa vitamina em espinafre e pêra congeladas sob diferentes temperaturas de congelamento (-22,3°C a -14,4°C) durante o período de 20 dias.

As perdas de vitamina C durante o processamento e estocagem de alimentos se devem principalmente às reações não-enzimáticas, oxidativas e não oxidativas (WONG, 1995). Na degradação não oxidativa o ácido L-ascórbico se converte a 2-furaldeído e dióxido de carbono, sendo catalisada por ácido. As geléias possuem um

baixo valor de pH, o que fornece um meio favorável para que ocorra este tipo de reação. Na degradação oxidativa, a qual ocorre pela presença de O₂ no interior da embalagem, ocorre o escurecimento em meio ácido, devido a conversão do ácido L-ascórbico em ácido dehidroascórbico e no ácido D-isoascórbico (estereoisômero) (GIANNAKOUROU & TAOUKIS, 2003; HIDIROGLOU et al., 1998; WONG, 1995).

Burdurlu et al. (2005) refere-se também que durante o processamento de alimentos, um dos produtos decorrentes da decomposição do ácido L-ascórbico é o hidroximetilfurfural (HMF), precursor dos pigmentos marrons presentes em reações de escurecimento não-enzimático envolvendo açúcares, fato que também pode vir a ter influenciado na cor mais escura das geléias.

4.2.4 Conteúdo de tocoferóis

Os alimentos derivados de frutas e hortaliças, contém, no geral, baixos níveis de vitamina E, e após a colheita, a alteração no conteúdo de vitamina E pode ser causada por uma série de fatores, incluindo os procedimentos durante o processamento, tempo e condições de estocagem, preparação da amostra e variação dos métodos analíticos de quantificação (CHUN et al., 2006).

A figura 18 representa o cromatograma típico de separação e identificação de tocoferóis em geléias de amora-preta. Similar ao ocorrido na determinação de tocoferóis no fruto *in natura*, o método de identificação e quantificação gerou picos de boa assimetria, o que reduz erros de integração e quantificação dos compostos.

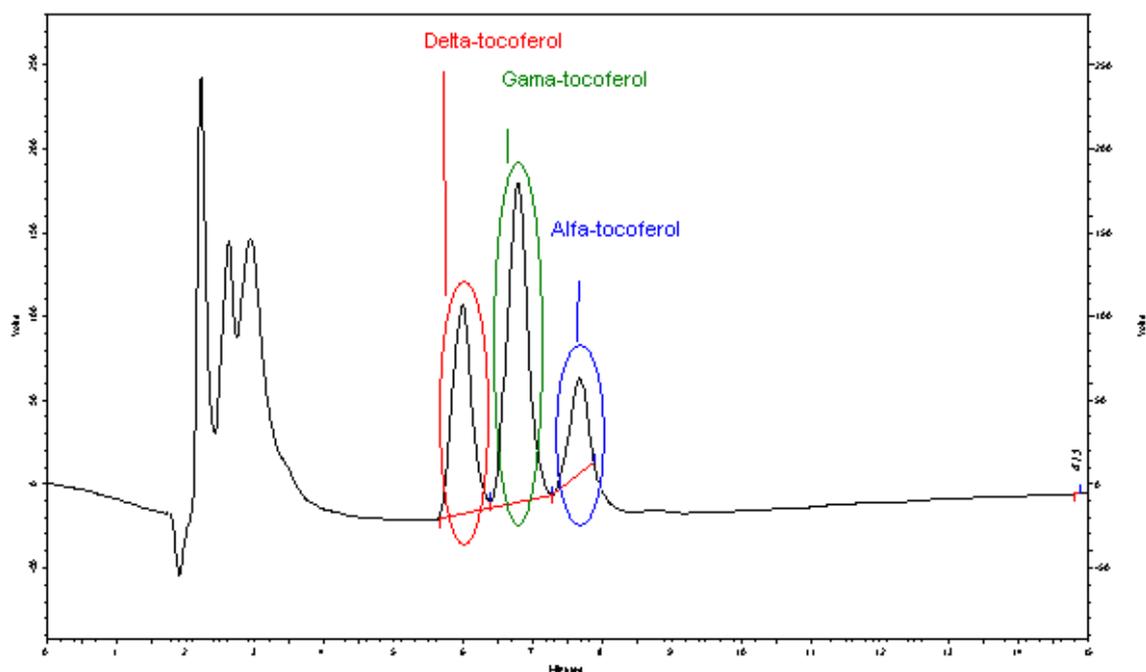


FIGURA 18. Cromatograma que representa a separação dos tocoferóis em geléia *light* de amora-preta (*Rubus* sp) cv. Tupy.

Na tabela 15 estão expostos os dados referentes à quantificação de tocoferóis, soma do conteúdo dos picos que representam os tocoferóis individuais, presentes nas geléias de amora-preta cv. Tupy.

TABELA 15. Conteúdo de tocoferóis (em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) presentes nas geléias convencional e *light* de amora-preta cv. Tupy (*Rubus* sp).

Geléia	Tempo de armazenamento (meses)			
	0	2	4	6
Convencional	0,760Aa±0,03	0,599Bb±0,04	0,538Bc±0,05	0,178Bd±0,03
Light	0,744Ba±0,05	0,715Ab±0,05	0,703Ac±0,02	0,704Ac±0,02

Média de três determinações ± estimativa de desvio padrão

Letras minúsculas diferentes na mesma linha mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para a mesma geléia entre os tempos de armazenamento.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre os tipos de geléias no mesmo tempo de armazenamento.

nd= não detectado

Com base nos dados da tabela 15, pode-se observar que as geléias apresentam um conteúdo de tocoferóis (em base úmida) superior ao do fruto *in natura* (Tabela 8).

Observou-se um decréscimo significativo dos tocoferóis na geléia convencional durante o período de armazenamento, representando perdas de até 76% ao final de seis meses, sendo que a maior taxa de degradação foi observada ao sexto mês de armazenamento.

No entanto, o conteúdo de tocoferóis apresentou-se praticamente o mesmo na geléia *light* durante o período de armazenamento na temperatura ambiente, representando ao final do período de seis meses perdas de apenas 7%. O que pode estar vinculado a as menores taxas de degradação dos tocoferóis na geléia *light* seriam efeitos protetores do meio, o que evitaria ou retardaria sua degradação, como por exemplo o maior conteúdo de compostos fenólicos restantes nesta geléia ao final do período de armazenamento.

4.2.5 Conteúdo individual de ácidos fenólicos e de flavanols

Na figura 19 está exposto o cromatograma típico de separação dos ácidos fenólicos presentes em geléias de amora-preta. O cromatograma apresenta-se similar ao cromatograma da polpa *in natura* (Figura11), porém com maiores amplitudes de resposta dos compostos detectados, indicando uma quantidade superior de ácidos fenólicos na amostra.

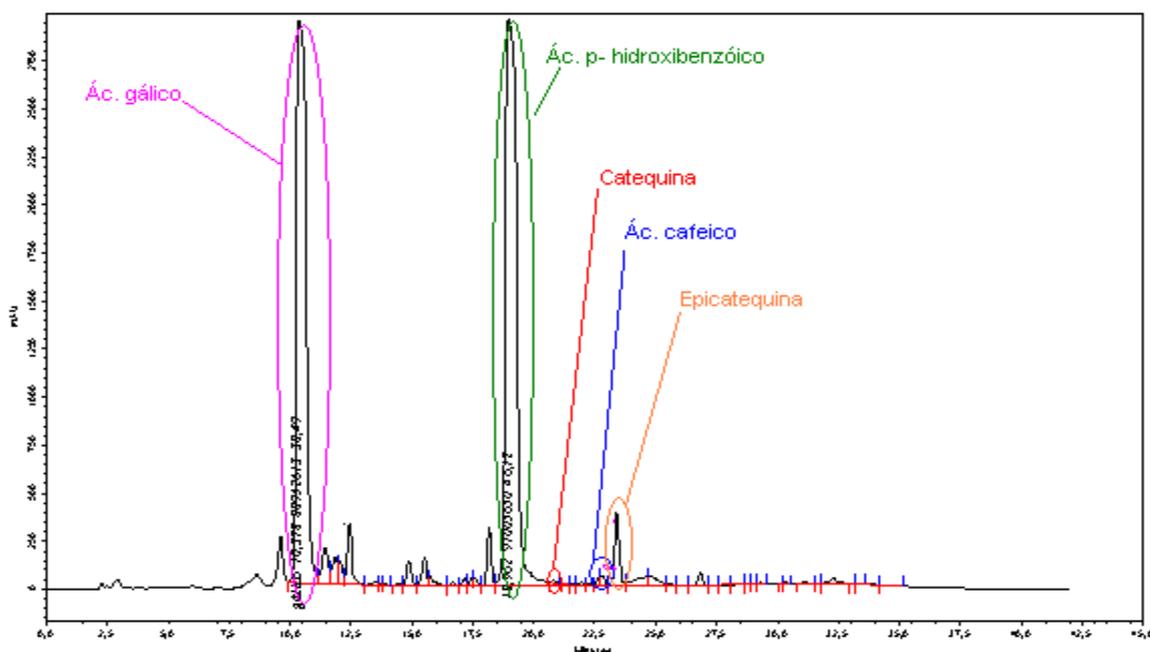


FIGURA 19. Cromatograma típico de identificação de ácidos fenólicos e flavonols em geléia *light* de amora-preta (*Rubus* sp) cv. Tupy.

Os principais compostos fenólicos identificados, tanto na geléia convencional quanto na geléia *light*, são o ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico e a epicatequina (Tabela 16). Identificou-se também em quantidades menores o ácido cafeico em ambas as geléias, e a catequina e o ácido p-cumárico somente na geléia convencional.

TABELA 16. Principais ácidos fenólicos (em mg.100g⁻¹) presentes em geléia convencional e *light* de amora-preta (*Rubus* sp) cv. Tupy, durante o período de armazenamento.

Composto fenólico	Tempo de armazenamento (meses)	Geléia	
		Convencional	<i>Light</i>
Ácido gálico	0	759,30Aa±2,1	491,10Ba±2,6
	2	757,85Ab±2,3	484,43Bb±2,6
	4	723,86Ac±2,0	478,42Bc±1,8

	6	643,23Ad±1,9	477,91Bd±2,2
Ácido p- hidroxibenzóico	0	1177,5Aa±2,4	759,52Ba±2,7
	2	1175,3Ab±1,8	736,28Bb±2,8
	4	1150,3Ac±2,2	730,68Bc±2,4
	6	1102,7Ad±2,5	729,47Bd±2,5
	0	6,07Aa±0,6	2,94Ba±0,4
Catequina	2	5,25Ab±0,7	3,01Ba±0,7
	4	4,08Ac±0,8	2,96Ba±0,4
	6	2,54Ad±0,5	1,29Bb±0,6
	0	5,70a±0,7	Nd
	2	5,41a±0,8	Nd
Ácido p-cumárico	4	5,55a±0,9	Nd
	6	5,39a±0,8	Nd
	0	3,22Aa±0,7	2,94Aa±0,8
	2	3,11Aa±0,6	2,44Bb±0,6
Ácido cafeico	4	3,16Aa±0,5	1,76Bc±0,4
	6	3,08Aa±0,6	0,71Bd±0,04
	0	290,85Aa±0,8	163,53Ba±1,5
	2	260,10Ab±0,9	158,57Bb±1,1
Epicatequina	4	233,67Ac±1,0	159,02Bb±1,8
	6	230,92Ad±0,8	158,71Bc±1,0

Média de três determinações ± estimativa de desvio padrão

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para a mesma geléia entre os tempos de armazenamento.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre os tipos de geléias no mesmo tempo de armazenamento.

nd: não detectado

A figura 20 representa o conteúdo de ácidos fenólicos e flavanols individuais presentes na polpa *in natura* de amora-preta cv. Tupy e o conteúdo nas geléias convencional e *light* logo após o processamento.

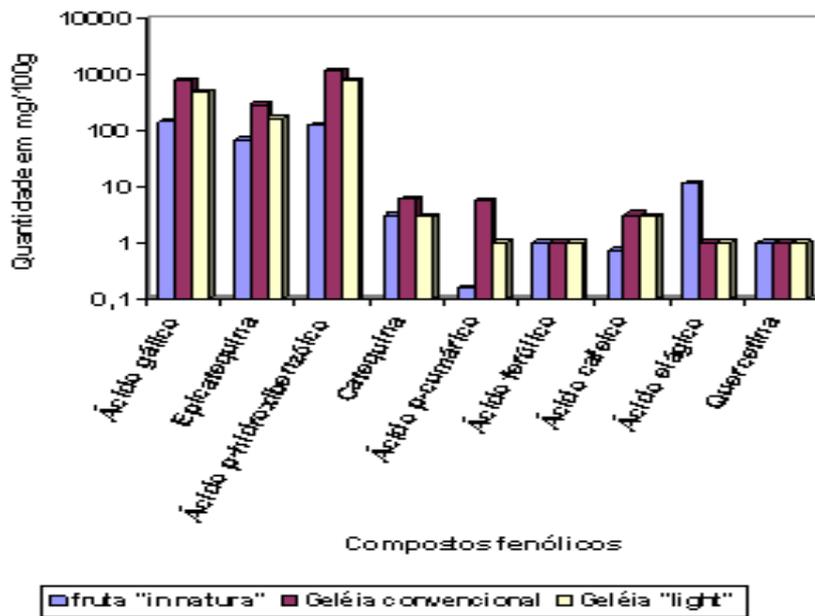


FIGURA 20. Conteúdo de compostos fenólicos na polpa *in natura* e nas geléias convencional e *light* de amora-preta cv. Tupy, logo após o processamento.

Observa-se um conteúdo superior (em base úmida) de ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico e da epicatequina, nas geléias logo após o processamento, quando comparado com o conteúdo destes compostos na polpa *in natura*.

De um modo geral, se observa uma perda significativa dos compostos fenólicos durante o período de armazenamento, tanto para a geléia convencional quanto para a geléia *light*.

Pelos dados da tabela 16 observa-se que as maiores perdas de ácidos fenólicos ao final dos seis meses de armazenamento na geléia convencional, foram para a catequina (58%), epicatequina (20,6%) e para o ácido gálico (15%). Foram observadas perdas menores de ácido p-hidroxibenzoico (6,3%), ácido p-cumárico (5,4%) e de ácido cafeico (4,3%). Observa-se que o maior percentual de perdas ocorreu entre o quarto e sexto mês de armazenamento, para a catequina (38%), ácido gálico (11%) e ácido p-hidroxibenzoico (4%). Somente a epicatequina apresentou o maior percentual de perdas no quarto mês de armazenamento (10%).

Observa-se que as perdas durante os seis meses de armazenamento do ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico, catequina e epicatequina foram inferiores na

geléia *light* do que as perdas ocorridas na geléia convencional, representado respectivamente, 2,7%, 3,9%, 56% e 2,9%. O composto que apresentou a maior taxa de redução foi o ácido cafeico, apresentando uma perda de 75,8% ao final de seis meses de armazenamento.

A maior taxa de redução dos compostos também ocorreu entre o quarto e sexto mês de estocagem, sendo mais pronunciado na geléia *light*, onde a catequina e o ácido cafeico apresentaram perdas de 57% e 60%, respectivamente.

Ao comparar as perdas de ácidos fenólicos ocorridas, de um modo geral, não se observou a mesma tendência da taxa de degradação entre a geléia convencional e a geléia *light*, mas em ambas as geléias as maiores perdas ocorreram após o quarto mês de estocagem.

Comparando a taxa de degradação dos compostos fenólicos individuais durante o armazenamento por seis meses nas geléias convencional e *light*, observa-se que somente a catequina apresentou um comportamento semelhante em ambas as geléias, apresentando uma redução em torno de 56-58%, ocorrendo a maior redução no sexto mês de armazenamento. A geléia convencional apresentou as maiores perdas para ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico, e epicatequina, representando perdas de 14%, 6,4% e 20,6%, respectivamente. Quando comparada às perdas para estes mesmos compostos na geléia *light*, observou-se perdas respectivamente de 2,7%, 3,9% e de 2,9%.

Em contrapartida, durante o armazenamento foram observadas maiores perdas de ácido cafeico na geléia *light*, representado 76%, perda bem superior ao observado na geléia convencional (4,4%). De um modo geral percebe-se um conteúdo superior de compostos fenólicos individuais na geléia convencional, possivelmente devido a maior hidrólise de taninos condensados e hidrolizáveis, devido ao aquecimento e maior tempo de exposição ao calor.

4.2.6 Determinação da capacidade antioxidante

Na tabela 17 estão expostos os valores da capacidade antioxidante das geléias de amora-preta cv. Tupy, logo após o processamento e durante o armazenamento de seis meses a temperatura ambiente.

TABELA 17. Capacidade antioxidante em geléias de amora-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy, durante o período de armazenamento.

Determinações	Tempo de armazenamento (meses)	Geléia	
		Convencional	Light
DPPH (em % de inibição de radicais livres)	0	71,20 Ba±0,8	75,00Aa±1,1
	2	63,05 Bb±0,6	65,13 Ab±0,8
	4	54,60Bc±1,2	62,20Ac±1,3
	6	48,55 Ad±0,9	49,28 Ad±1,1
Trolox relativa - DPPH ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ TE)	0	10,03Aa±1,2	10,59Aa±1,1
	2	8,84Bb±0,8	10,33Aa±0,9
	4	8,97Bb±0,7	9,81Ac±0,8
	6	7,96Bc±0,9	9,20Ad±0,6

Média de três determinações \pm estimativa de desvio padrão

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para a mesma geléia entre os tempos de armazenamento.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre as diferentes geléias no mesmo tempo de armazenamento.

DPPH= 1,1 difenil -2- picrilhidrazila; TE= equivalente a Trolox.

Observou-se uma redução significativa na capacidade antioxidante das geléias quando comparado com a polpa de amora-preta (tabela 10), cerca de 18% para a geléia convencional e de 14,5% para a geléia *light*.

A redução na capacidade antioxidante das geléias pode ser explicada pelas perdas dos compostos bioativos durante o processamento das geléias, como dos fenóis totais, vitamina C e tocoferóis, mas principalmente em relação as maiores perdas de antocianinas totais.

Durante o período de estocagem também ocorreu uma perda na capacidade antioxidante (em relação ao DPPH), a qual foi similar para as geléias convencional e *light*, representando respectivamente perdas de 31,8% e 34,0%, após seis meses de armazenamento.

As maiores perdas relativas da capacidade antioxidante da geléia *light* em relação a geléia convencional, não condiz com as perdas no conteúdo de compostos bioativos presentes com suposta ação antioxidante.

As perdas relativas do conteúdo total de antocianinas (86,5%) e de vitamina C (perda total) foram similares nas duas formulações de geléias durante o período de estocagem. No entanto, a perda relativa de compostos fenólicos totais, dos principais ácidos fenólicos e de tocoferóis foi superior na geléia convencional, a qual apresentou maior atividade antioxidante.

4.2.7 Avaliação instrumental da Cor

A perda da cor avermelhada e o aparecimento da cor marrom durante a elaboração e o armazenamento de alimentos processados, como as geléias, são influenciados por muitos fatores, incluindo as reações de Maillard, reações de escurecimento enzimático, degradação do ácido ascórbico e a polimerização de antocianinas com outros compostos fenólicos. Outros fatores que podem afetar a cor incluem o pH e a acidez da fruta, temperatura de estocagem e o tipo de cultivar (GARCÍA-VIGUERA et al., 1999).

Os dados referentes à análise instrumental de cor (ângulo Hue) das geléias convencional e *light* de amora-preta cv. Tupy, durante o período de armazenamento, encontram-se na tabela 18.

TABELA 18. Resultados dos ângulos de cor H^o (ângulo Hue) em geléias convencional e *light* de amora-preta (*Rubus* sp) cv. Tupy, durante o período de armazenamento.

Geléia	Tempo de armazenamento (meses)			
	0	2	4	6
Convencional	-12,26Aa±0,8	-10,19Ab±1,1	-8,30Ac±0,9	-7,49Ad±1,0
Light	-13,67Aa±0,9	-9,40Ab±1,2	-7,88Ac±1,0	-6,98Ad±1,0

Média de três determinações ± estimativa de desvio padrão

Letras minúsculas diferentes na mesma linha mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para a mesma geléia entre os tempos de armazenamento.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre as diferentes geléias no mesmo tempo de armazenamento.

As antocianinas são os principais compostos fenólicos presentes em *Rubus* sp que são responsáveis pela cor das frutas (presentes no tecido epidermal) e de seus produtos derivados (WROLSTAD & SKREDE, 2002). Com base nos dados da análise instrumental de cor, pode-se observar uma alta correlação entre o conteúdo

de antocianinas totais e o ângulo Hue, $R^2 = 0,95608$, para a geléia convencional (Figura 21); e $R^2 = 0,99553$, para a geléia *light* (Figura 22).

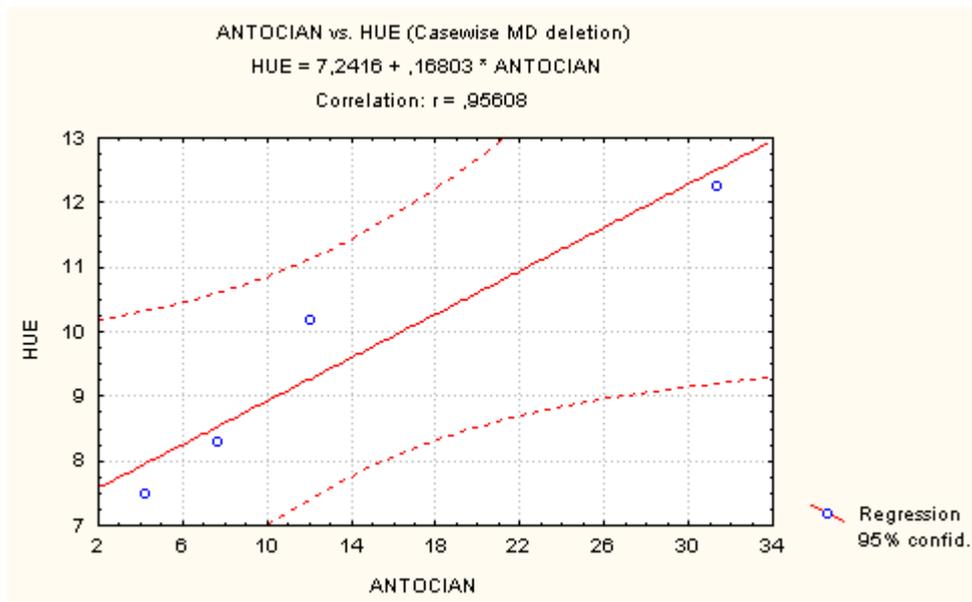


FIGURA 21. Correlação entre o ângulo Hue e o conteúdo de antocianinas totais em geléia convencional de amora-preta cv Tupy durante o armazenamento a temperatura ambiente.

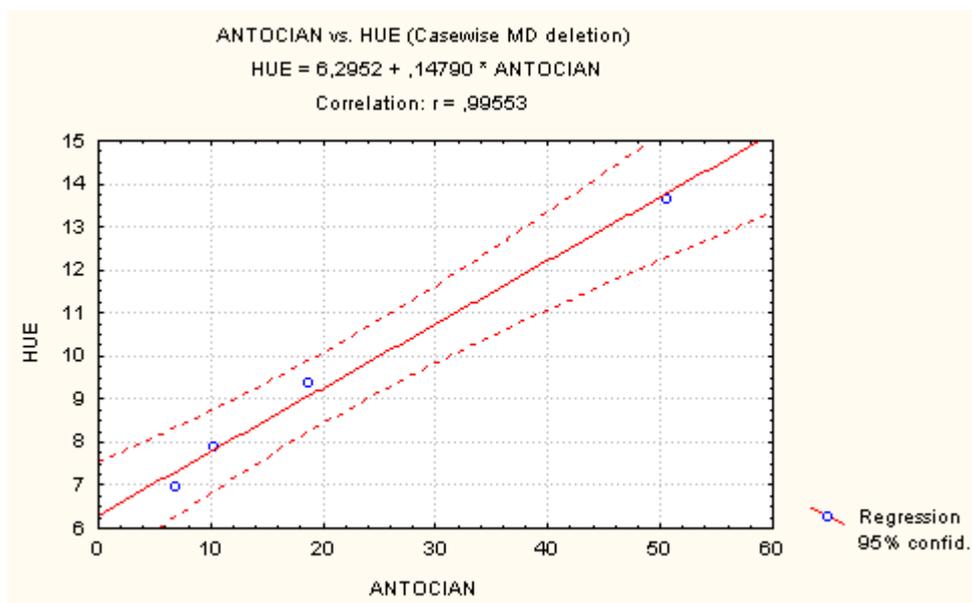


FIGURA 22. Correlação entre o ângulo Hue e o conteúdo de antocianinas totais em geléia *light* de amora-preta cv. Tupy no armazenamento a temperatura ambiente.

Após o processamento observou-se uma retenção no valor do ângulo Hue formado de 49,9% para a geléia *light* e de 44,8% para a geléia convencional, em relação à medida do referido ângulo no fruto de amora-preta cv. Tupy *in natura*.

Nos diferentes períodos de armazenamento em que foi medida a cor, observou-se que a alteração nos valores dos ângulos de cor H° (ângulo Hue) foi praticamente a mesma para as geléias convencional e a *light*, não se observando diferenças significativas entre os valores nas formulações.

Durante o período de estocagem observou-se uma retenção dos valores de ângulo Hue de 40% para a geléia convencional e de 49% para a geléia *light*, indicando uma coloração mais escura na geléia convencional. A perda de cor da geléia convencional não coincidiu com a taxa de redução de antocianinas totais nas geléias, pois para ambas as formulações a perda foi de aproximadamente 86,5%. Na geléia *light* observou-se uma maior retenção dos compostos fenólicos totais (fenóis e antocianinas), porém devido a menor quantidade de açúcares totais e menor exposição ao calor, provavelmente a caramelização de açúcares ocorreu em menor intensidade na geléia *light*.

A diferença significativa para os valores que descrevem a cor foi observada durante o período de armazenamento, tanto para a geléia convencional quanto na geléia *light*. Resultados com as mesmas tendências foram observados por García-Viguera et al. (1999) em geléia de morango, os quais atribuíram à temperatura de estocagem na faixa de 20 – 37°C e a incidência de luz combinada com a presença de O₂ no interior da embalagem, como as principais causas de perda de cor das geléias.

5 CONCLUSÃO

As cultivares de amora-preta Guarani, Tupy e Brazos apresentaram similaridade com relação a sua composição físico-química, exceto no conteúdo de açúcares totais, que foi inferior na cultivar Brazos, e pelo maior conteúdo de ácido L-ascórbico na cv. Tupy.

O conteúdo de compostos bioativos não inferiram individualmente na capacidade antioxidante no fruto *in natura* das cultivares Guarani, Tupy e Brazos, e nas geléias convencional e *light* de amora-preta cv. Tupy.

Os principais compostos fenólicos presentes nas cultivares de amora-preta e nas geléias são: ácido p-hidroxibenzóico, ácido gálico e epicatequina. Durante o processamento e o período de armazenamento das geléias convencional e *light*, ocorreu um decréscimo no conteúdo total de fenóis, no conteúdo total de antocianinas, de tocoferóis, de vitamina C e no conteúdo individual de fenóis.

Ao final do período de estocagem, as geléias *light* e convencional apresentaram similaridade de comportamento frente aos compostos bioativos, sem apresentar diferenças significativas na capacidade antioxidante.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAR, I. T.; STREIF, J.; BANGERTH, F. Effect of CO₂ and controlled atmosphere (CA) on the ascorbic and dehydroascorbic acid content of some berry fruits. **Postharvest Biology and Technology**, v. 11, p.47-55, 1997.

AMAKURA, Y.; UMINO, Y.; TSUJI, S; et al. Influence of jam processing on the radical scavenging activity and phenolic content in berries. **J. Agric. Food Chem.**, vol.48, p.6292-6297, 2000.

ANGELUCCI, D.E.; CARVALHO, C.R.L.; CARVALHO, P.R.N.; et al. **Análises Químicas de Alimentos – Manual técnico**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987. 56p.

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

ANTUNES, L.E.C.; FILHO, J.D.; SOUZA, C.M. Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.38, n.3, p. 413-419, 2003.

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

BARBOZA, G.L.G. **Obtenção e caracterização de sucos clarificados de amora-preta (Rubus spp. L.)**. Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Brasil. Março de 1999. 62 f.

BEATTIE, J.; CROZIER, A.; DUTHIE, G.G. Potencial health benefits of berries. **Current Nutrition & Food Science**, v.1, p. 71-86, 2005.

BIANCHI, M. de L. P. & ANTUNES, L.M. Radicais livres e os princípios antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOBBIO, P.A. & BOBBIO, F.O. **Introdução a Química de Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Varela, 1992. 151p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente à informação nutricional complementar. On-line. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2798.htm. Acesso em: 5 jan. 2005.

BRASIL a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº40, de 21 de março de 2001. Regulamento técnico sobre o valor calórico. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 57-E, p. 22-25, 22 mar. 2001. Seção 1.

BRASIL b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 34, de 9 de março de 2001. Regulamento que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 21: "Preparações culinárias industriais". On-line. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/34-01rdc.htm. Acesso em: 20 jun., 2005.

BUTKOVIC, V.; KLASINC, L.; BORS, W. Kinetic Study of Flavanoid Reactions with Stable Radicals. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 2816-2820, 2004.

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

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica ilustrada**. 2^o ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996, p. 335-336.

CHIM, J.F. **Influência da combinação de edulcorantes sobre as características e retenção de vitamina C em geléias *light* mista de pêssego (*Prunus persica*) e acerola (*Malpighia punicifolia*)**. Pelotas, 2004. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área de concentração Ciência e Tecnologia Agroindustrial), Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

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

CHUN, J. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 196-204, 2006.

COULTATE, T.P. **Alimentos – Química de sus componentes**. Zaragoza: Acribia, 1994. 199p.

DAO, L.T.; TAKEOKA, G.R.; EDWARDS, R.H.; et al. Improved method for the stabilization of anthocyanidins. **J. Agric. Food Chem.**, Vol. 46, p. 3564-3569, 1998.

DAVIES, M. B.; AUSTIN, J.; PARTIDGE, D.A. **Vitamin C: Its chemistry and biochemistry**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1991. 154 p.

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

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 505-512, 2006.

DORTA, Daniel J. **Efeitos citoprotetor e/ou citotóxico dos flavonóides: estudo estrutura-atividade envolvendo mecanismos mitocondriais, com ênfase na apoptose**. Ribeirão Preto, 2007. 166 f. Tese (Doutorado em Toxicologia, área de concentração Toxicologia), Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J dos; GENOVESE, M.I. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.2, p. 446-452, 2006.

DUGO, P.; MONDELLO, L.; ERRANTE, G. et al. Identification of Anthocyanins in Berris by Narrow Bore High- Performance Liquid Chromathography with Electrospray Ionization Detection. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 3987-3992, 2001.

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

FANG, Z.; ZHANG, M.; WANG, L. HPLC-DAD-ESIMS analysis of Phenolic compounds in bayberries (*Myrica rubra Sieb. Et Zucc.*). **Food Chemistry**, v.100, p. 854-852, 2007.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. 1095p.

FONTANNAZ, P.; KILINÇ, T.; HEUDI, O. HPLC-UV determination of total vitamin C in wide range of fortified food products. **Food Chemistry**, v.94, p. 626-631, 2006.

GARCÍA-VIGUERA, C.; ZAFRILLA, P.; ROMERO, F. Color stability of strawberry jam as affected by cultivar and storage temperature. **Journal of Food Science**, v.64, n.2, 1999.

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

GAVA, A. J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. 1^o ed. São Paulo: Nobel, 1984. 283 p.

GIANNAKOUROU, M.C.; TAOUKIS, P.S. Kinetic modeling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions. **Food Chemistry**, v.83, p. 33-41, 2003.

GRANADO-LORENCIO, F. et al. In Vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetable. **Food Chemistry**, v. 102, p. 641-648, 2007.

GREEN, A. Soft fruits. In: HULME, A.C. **The biochemistry of fruits and their products**. London: Academic Press. 1971. v.2. p. 375-410.

HÄKKINEN, S. H.; KÄRENLAMPI, S. O.; HEINONEN, M.; et al. HPLC Method for Screening of Flavonoids and Phenolic Acids in Berries. **J. Sci. Food Agric.**, v. 77, p. 543-551, 1998.

HAKKINEN, S. H; KARENLAMPI, S. O.; MYKKANEN, H. M. et al. Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. **Eur. Food Res. Technol.** V. 212, p. 75-80, 2000.

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

HIDIROGLOU, N.; MADERE, R.; BEHRENS, W. Electrochemical determination os ascorbic acid and isoascorbic acid in ground meat and in processed foods by high pressure liquid chromatography. **Journal of Food composition and Analysis**, v.11, p. 89-96, 1998.

HO, P.; HOGG, T.A.; SILVA, M.C.M. Application of liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. **Food Chemistry**, vol.64, p.115-122, 1999.

HOWARD, L.R.; SMITH, R.T.; WAGNER, A.B. et al. Provitamin A e ascorbic acid content of fresh pepper cultivars (*Capsicum annum*) and processed jalapenos. **Journal of Food Science**, v. 59, n.2, p. 362-365, 1994.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2 ed. São Paulo, 1985. 371p.

JACKIX, M. H. **Doces, geléias e frutas em calda**. Campinas: ed. UNICAMP: São Paulo: Ícone, 1988. 169 p.

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

KIM, Y.N. et al. Tocopherol and carotenoid contents of selected Korean fruits and vegetable. *Journal of food composition and Analysis*, v. 20, p. 458-465, 2007.

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

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; GARCÍA-PARILLA, M. C.; et al. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.24, nº4, oct/dec. 2004.

LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analysis in Cranberries. **Hortiscience**, v.7, nº1, p.83-84, 1972.

LIMA, V. L. A.; GUERRA, N. B. Antocianinas: atividade antioxidante e biodisponibilidade. **Bol. SBCTA**, v.37, p. 121-128, dez.2003.

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

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S.da. Antocianinas em suco de uva: Composição e estabilidade. **B. CEPPA**, Curitiba, v.21,n.1, p. 59-82 jan./jun., 2006.

MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **B. CEPPA**, Curitiba, V. 22, n. 2, p. 233-252, jul/dez. 2004.

MARTINEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGOS, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr. Hosp.**, v. XVII,n.6, p. 271-278, 2002.

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

MEYER, A.S.; HEINONERN, M.; FRANKEL, E.N. Antioxidant interaction of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food Chemistry**, v.61, n.1/2, p. 71-75, 1998.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 577-599, 2000.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; van BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v.85, p.231-237, 2004.

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

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

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

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, jul/dez. 2004.

NIELSEN, I. L.F.; HAREN, G.R.; MAGNUSSEN, E.L.; et al. Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and antioxidativa potency. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 5861-5866, 2003.

NGO, T., WROLSTAD, R.E.; ZHAO, Y. Color quality of Oregon strawberries-impact of genotype, composition, and processing. **Journal of Food Science**, v.72, n. 1, p. 25-32, 2007.

OUGH, C. S.; AMERINE, M. A. *Methods for Analysis of Musts and Wines*, 2^o edition. **A Wiley- Interscience publication**, New York. 1996. p. 365.

PANTELIDIS, G.E.; VASILAKAKIS, M. MANGANARIS, G.A.; et al. 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.

PLESSI, M.; BERTELLI, D.; ALBASINI, A. Distribution of metal and Phenolic compounds as a criterion to evaluate variety of berries and related jams. **Food Chemistry**, v.100, p. 419-427, 2007.

RASEIRA, M. C.; ANTUNES, L. E. **Aspectos Técnicos da cultura da Amora-preta**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 54p.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

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

RODRIGUES-AMAYA, B.B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILST Press. 2001. 64p.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 22, p. 19-34, 2002.

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

SELLAPPAN, S. AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p. 2432-2438, 2002.

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

SILVA, R. da S e. **Potencial antioxidante correlacionado com fenóis totais e antocianinas de cultivares de mota-preta, mirtilo, morango e pêssego**. Dissertação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Pelotas, 2007. 58 f.

SINGLETON, V.L.;ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics withphosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Vitic.**,v.16, p. 144-158, 1996.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 1104p.

SIQUEIRA, F. M. et al. Nutrientes antioxidantes. **Bol SBCTA**, n.2, v. 31, p. 192-199, 1997.

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

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M. et al. Phenols, proanthocyanins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**. V. 89, p. 191-198, 2005.

STATSOFT- **Statistica**. Tulsa: Statsoft, 2000, software version 6.0.

STINTZING, F.C.; STINTZING, A.S.; CARLE, R.; et al. A novel zwitterionic anthocyanin from Evergreen blackberry (*Rubus laciniatus Willd.*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 396-399, 2002.

VEAZIE, P.P.; COLLINS, J. K. Quality of erect-type blackberry frit after short intervals of controlled atmosphere storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.25, p.235-239, 2002.

VENDRAMINI, A.L.; TRUGO, L.C. Phenolic Compounds in Acerola Fruit (*Malpighia puniceifolia, L.*). **J. Braz. Chem. Soc.**, v.15, n. 5, p. 664-668, 2004.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; MOYÁ, M.L.; et al. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v.50, p.250-256, 2006.

VINCI, G.; ROT, F.; MELE, G. Ascorbic acid in fruits: a liquid chromatographic investigation. **Food Chemistry**, v.53, p.211-214, 1995.

VITAMINA E – imagem. Disponível em: www.hipocampo.org/images_art/tocoferol.gif Acesso em: 22 nov. 2007.

WROLSTAD, R.E.; SKREDE, G. **Functional foods: biochemical and processing aspects**. Vol. 2. London: CRC Press, 2002. 595p.

YUSUF, Y.; TOLEDO, R.T. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p. 255-260, 2004.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic Acid in some Small Berries. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.2118-2124, 2005.

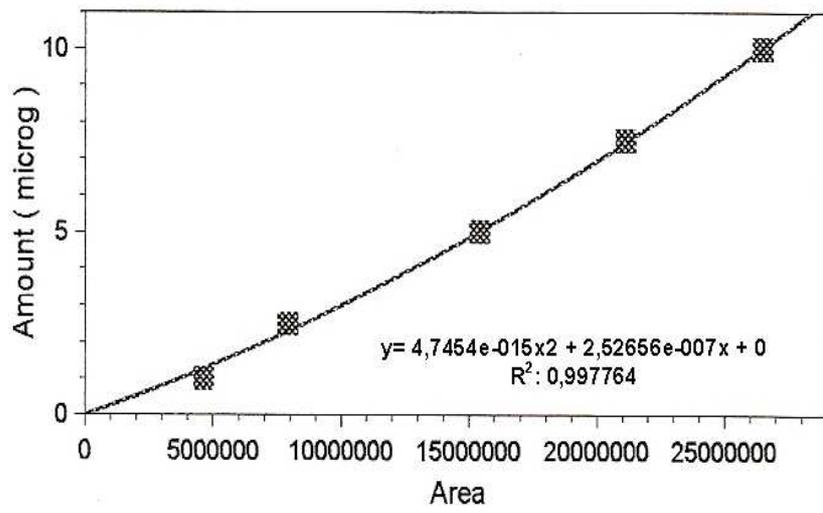
ZAFRILLA, P.; FERRERES, F; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 3651-3655, 2001.

ZAMBIAZI, R.C. **The role of endogenous lipid components on vegetable oil stability**. Foods and Nutritional Sciences Interdepartmental Program. University of Manitoba Winnipeg, Manitoba, Canada. April 1997. 304 p.

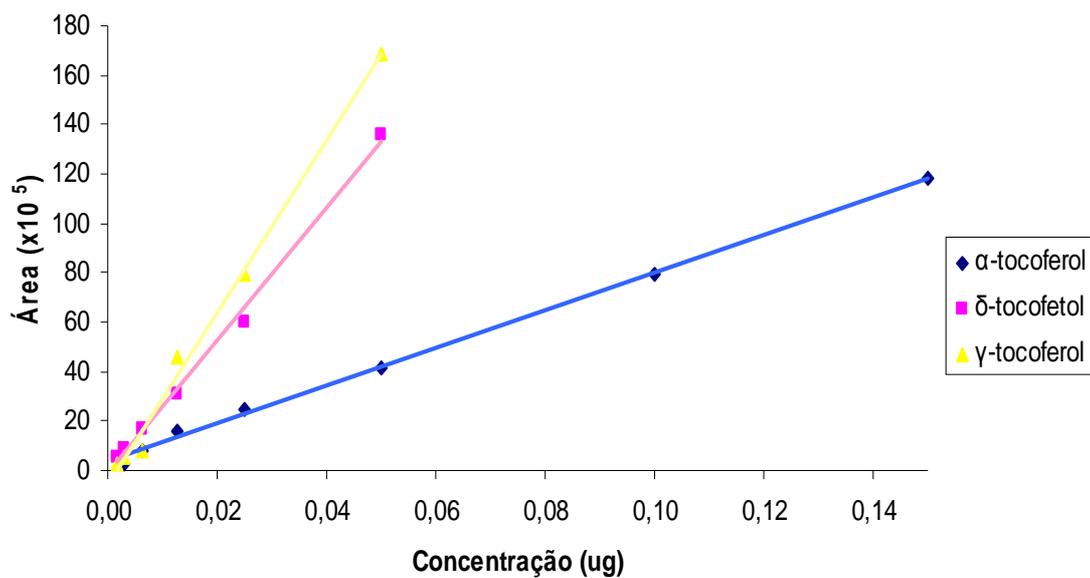
ZHANG, Y.; HU, X.S.; CHEN, F. et al. Stability and color characteristics of PEF-treated cyaniding-3-glicoside during storage. **Food Chemistry**, v. 106 , p. 669-679, jan. 2008.

APÊNDICE A. Curva de calibração (padrão externo) de ácido L-ascórbico.

Peak: vitaminaC -- ESTD



APÊNDICE B. Curvas de calibração (padrão externo) de compostos α -, δ - e γ -tocoferol.



α-tocoferol: $y=375755+76067628x$

$R^2: 0,9979$

γ-tocoferol: $y=-553002+348445746x$

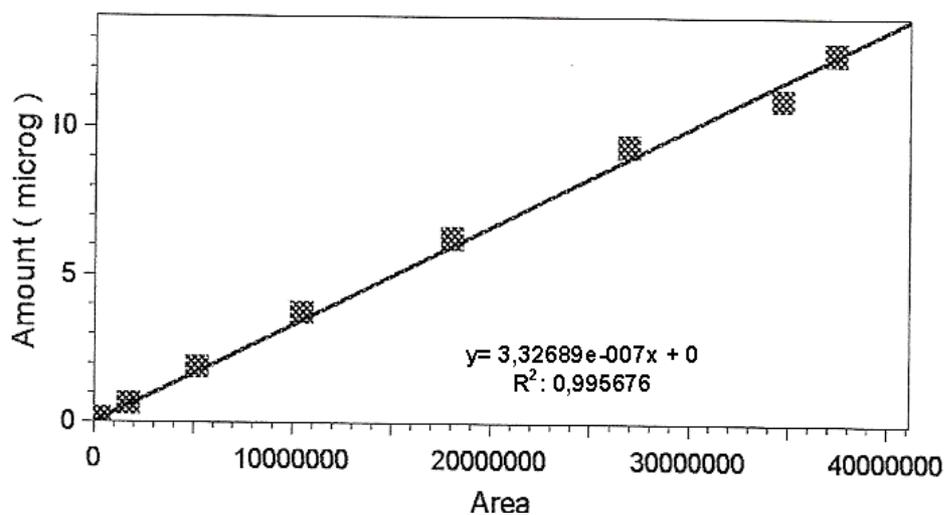
$R^2: 0,9932$

δ-tocoferol: $y=-77585+267516328x$

$R^2: 0,9956$

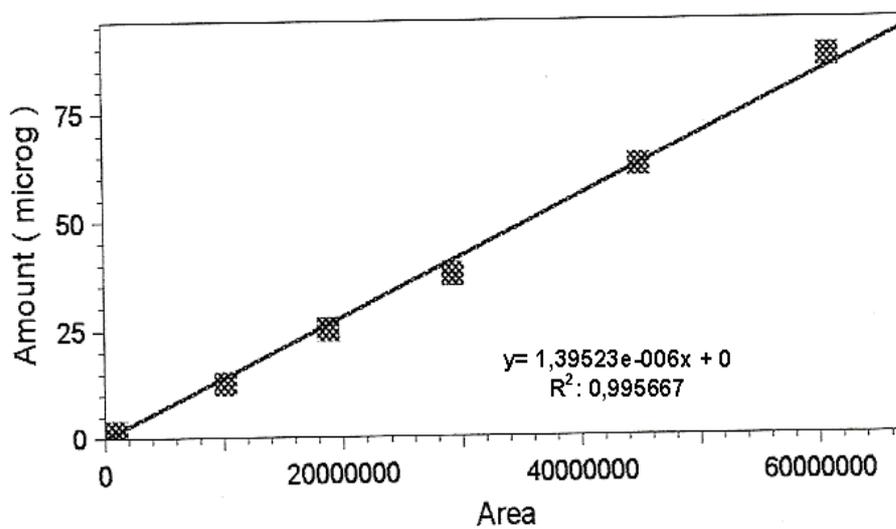
APÊNDICE C. Curvas de calibração (padrão externo) dos compostos fenólicos: ácido gálico (a) e catequina (b).

Peak: gálico -- ESTD



(a)

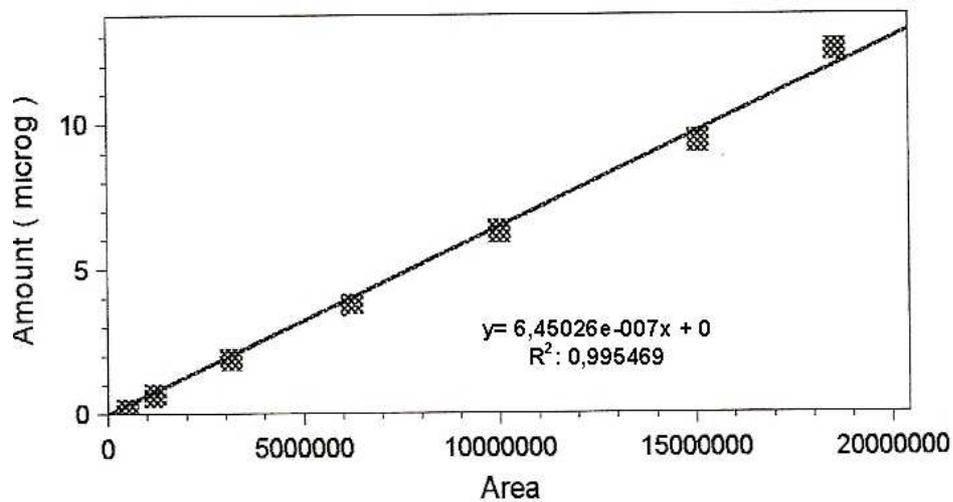
Peak: catequina -- ESTD



(b)

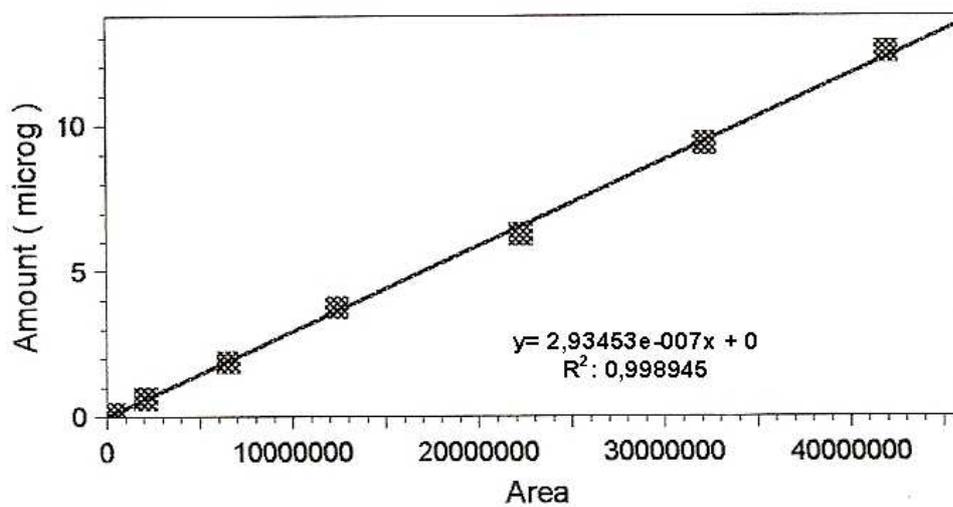
APÊNDICE D. Curvas de calibração (padrão externo) dos compostos fenólicos: ácido p-hidroxibenzóico (a) e ácido cafeico (b).

Peak: p-hidroxibenzoico -- ESTD



(a)

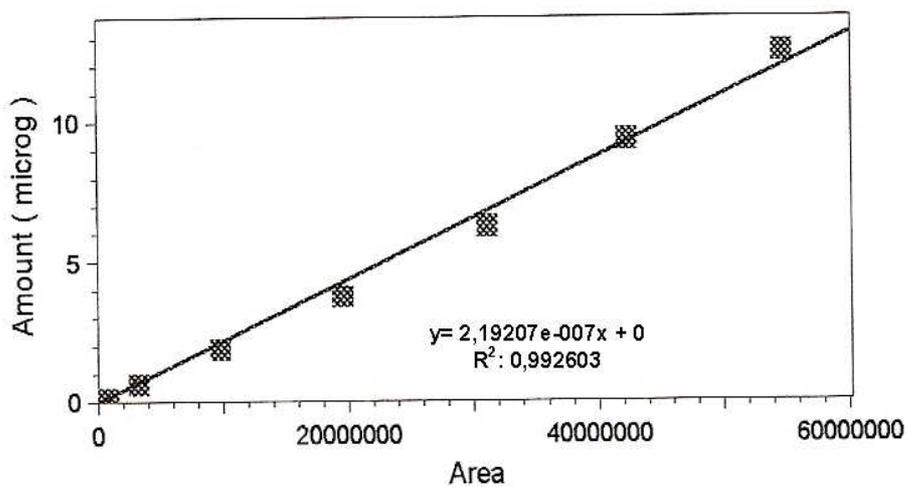
Peak: cafeico -- ESTD



(b)

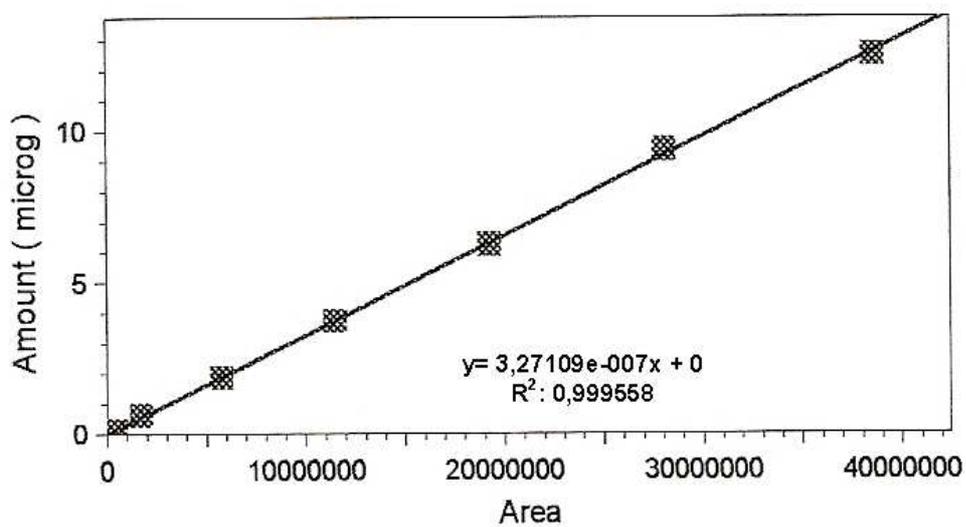
APÊNDICE E. Curvas de calibração (padrão externo) dos compostos fenólicos: ácido p-cumárico (a) e ácido ferúlico (b).

Peak: p-cumárico -- ESTD



(a)

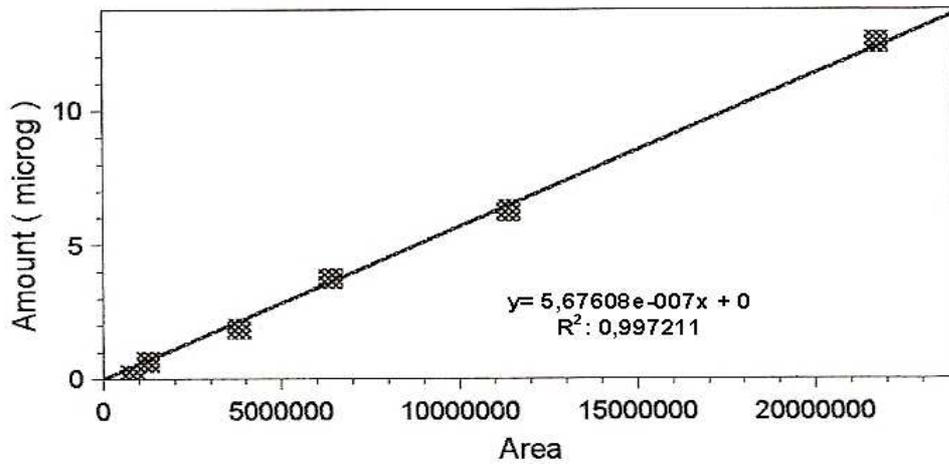
Peak: ferúlico -- ESTD



(b)

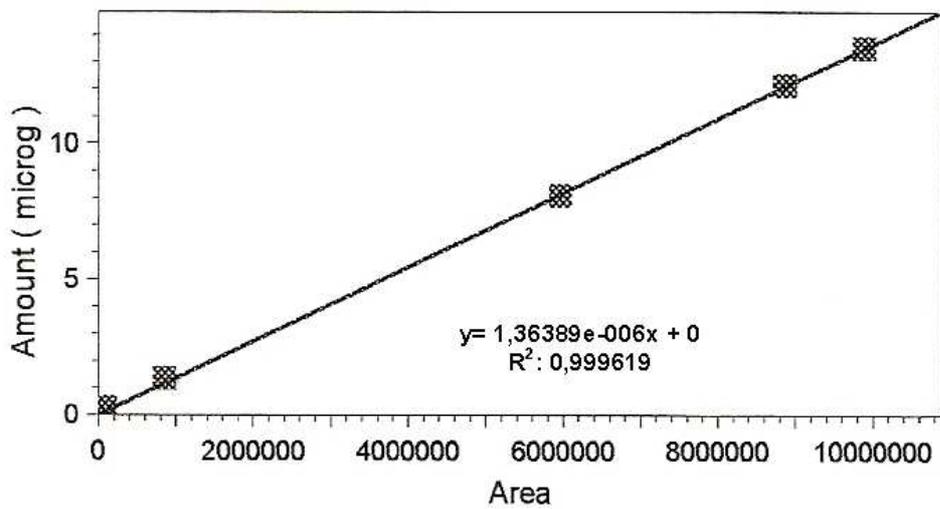
APÊNDICE F. Curvas de calibração (padrão externo) dos compostos fenólicos: ácido elágico (a) e miricetina (b).

Peak: elágico -- ESTD



(a)

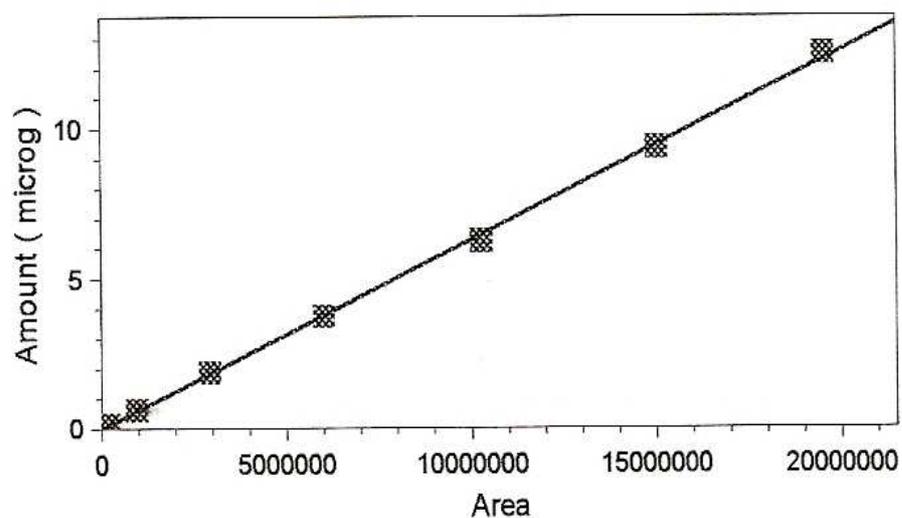
Peak: miricetina -- ESTD



(b)

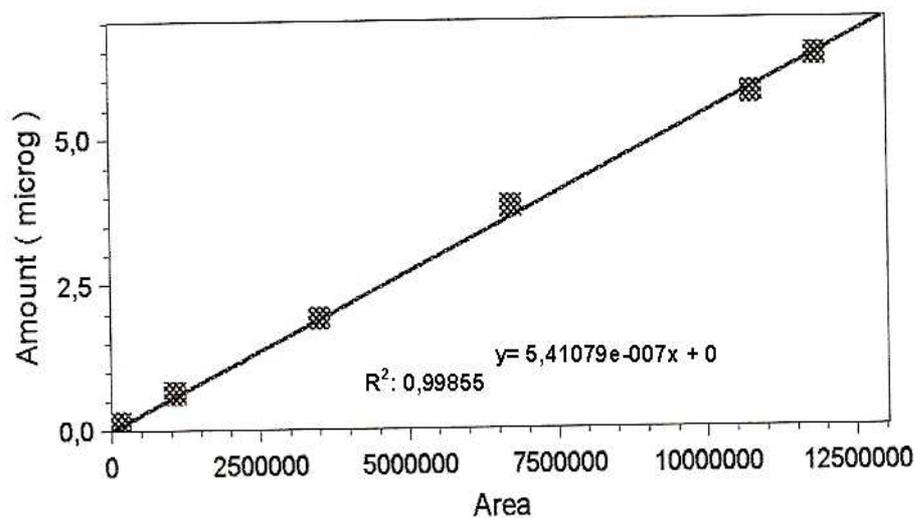
APÊNDICE G. Curvas de calibração (padrão externo) dos compostos fenólicos: quercetina (a) e campferol (b).

Peak: quercetina -- ESTD



(a)

Peak: kaempferol -- ESTD



(b)

APÊNDICE H. Curva de calibração (padrão externo) do composto fenólico: epicatequina.

Peak: epicatequina -- ESTD

