

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DOS ALIMENTOS**

**VALOR NUTRICIONAL E CAPACIDADE**  
**ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE**  
**AMORA-PRETA (*Rubus sp.*)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Gabriela Elisa Hirsch**

**Santa Maria, RS, Brasil,**

**2011**

**VALOR NUTRICIONAL E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE  
DIFERENTES GENÓTIPOS DE AMORA-PRETA (*Rubus sp.*)**

**por**

**Gabriela Elisa Hirsch**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de  
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos,  
Área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

**Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Tatiana Emanuelli**

**Santa Maria, RS, Brasil,  
2011**

**Universidade Federal de Santa Maria**  
**Centro de Ciências Rurais**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**Valor nutricional e capacidade antioxidante de diferentes genótipos de  
amora-preta (*Rubus sp.*)**

elaborada por

**Gabriela Elisa Hirsch**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**Comissão Examinadora:**

---

**Tatiana Emanuelli, Dr<sup>a</sup>**  
**(Presidente/Orientador)**

---

**Paula Rossini Augusti, Dr<sup>a</sup> (Unipampa)**

---

**Claúdia Kaehler Sautter, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

Santa Maria, 04 de fevereiro de 2011.

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais, Paulo e Roseli,  
aos meus irmãos, Danusa e Leandro,  
por todo amor, incentivo ao estudo e  
confiança no meu sucesso.**

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, por estar sempre comigo me dando força para continuar!

Aos meus amados pais, Paulo André Hirsch e Roseli Lúcis Hirsch, pelo exemplo de caráter, dedicação e força; por me incentivarem sempre a estudar e buscar meus sonhos; por me incentivar a seguir sempre!

Aos meus irmãos, Leandro e Danusa, pelo apoio e dedicação!

Ao meu namorado Sérgio Alberto Righi Filho, pelo companheirismo, apoio, paciência, compreensão, amor, motivação e intensa dedicação dispendidos em todos os momentos.

Às minhas amigas e colegas, Karina, Karine, Aline, Juliana, Camila, Jaqueline e Letícia por tornarem essa caminhada mais leve.

À Elizete Maria Pesamosca Facco, pelo modelo de caráter na simplicidade e companheirismo e, excelência profissional como educadora, além da sua dedicação em ensinar os primeiros princípios de laboratório e ajuda, mesmo quando já estava longe.

Aos meus avós, Rosinda e Olívio Hirsch e Irmngardia Rech por me incentivarem a estudar e sentirem orgulho da neta.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Tatiana Emanuelli, pela sua orientação e seu apoio. Obrigada por partilhar seus conhecimentos, pela disposição e dedicação na contribuição de minha formação.

A Daniele Rodrigues e Cristiane Denardim, pela ajuda no trabalho e amizade.

A professora Amélia Henriques e Ana Aboy pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos Ana Paula Daniel, Ana Paula Veeck, Jaqueline Piccolo e Milena Bagetti, pelos momentos de descontração, carinho e apoio. Obrigada gurias!

Ao pessoal do Nidal, Andréia Quatrin, Greicy Marafiga Conterato, Luana Maurer, Paula Augusti, Roger Wagner, Taís Unfer, Bruna Klein, Amanda Ruviaro, Vanessa Knapp e Alberto dos Santos, que fizeram parte dessa caminhada e de certa forma colaboraram para a execução desse trabalho.

Aos alunos do curso de Farmácia pela oportunidade de iniciar na docência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa para desenvolvimento desse trabalho.

À todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a execução desse trabalho.

Obrigada!!

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### **VALOR NUTRICIONAL E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE AMORA-PRETA (*Rubus sp.*)**

AUTORA: GABRIELA ELISA HIRSCH.  
ORIENTADORA: TATIANA EMANUELLI.  
CO-ORIENTADORA: ELIZETE MARIA PESAMOSCA FACCO  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 04 de fevereiro de 2011.

Sendo o Rio Grande do Sul um dos principais produtores de amora-preta (*Rubus sp.*) do Brasil e devido a escassez de trabalhos avaliando esta fruta neste país, este trabalho teve como objetivo a caracterização nutricional e de compostos bioativos de diferentes genótipos de amora-preta do Rio Grande do Sul, bem como a avaliação da sua capacidade antioxidante. Foram avaliadas amoras-pretas de diferentes genótipos (seleções 07/001, 03/001, 02/96 e 99 e cultivares Guarani, Cherokee, Tupy e Xavante) que estão sendo cultivadas na Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS, Brasil, 31°40'47''S, 52°26'24''O, 60 m). As frutas apresentaram umidade entre 84,8 e 90,3%; proteína entre 0,09 e 0,14%, fibra alimentar entre 5,8 e 5,5% e cinzas entre 0,27 e 0,49%. A seleção 02/96 apresentou menor teor de cinzas. Os SST variaram entre 7,3 a 10,2 °Brix, a acidez variou entre 1,30 e 1,58% em ácido cítrico e o pH entre 2,8 e 3,1. A seleção 03/001 apresentou menor valor de SST que as demais e menor tendência ao vermelho, mas maior intensidade de cor que a cultivar Tupy. Os ácidos graxos encontrados em maior concentração foram o ácido palmítico (22-29%), oléico (13-32%) e linoléico (15-33%), com pequenas diferenças nas concentrações entre os tipos de amora. Quatro diferentes ensaios foram realizados para avaliar a atividade antioxidante de tanto de extratos fenólicos quanto antociânicos obtidos das amoras-pretas. Quanto aos extratos fenólicos, as seleções 02/96 e 07/001 apresentaram maior atividade antioxidante do que as cultivares na maioria dos ensaios, e esta atividade foi parcialmente correlacionada com a maior quantidade de fenólicos totais nestas amostras. Assim, os compostos fenólicos são provavelmente os principais responsáveis pela atividade antioxidante nos ensaios de remoção do radical difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A quercetina parece ser a responsável pela atividade

antioxidante dos extratos fenólicos da amora no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Quanto aos extratos antociânicos, a seleção 02/96 e as cultivares Tupy e Cherokee da safra de 2007 apresentaram maior atividade antioxidante que os outros genótipos, na maioria dos ensaios. Antocianinas parecem ser as principais responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos antociânicos nos ensaios de DPPH e FRAP, embora o ácido ascórbico também tenha contribuído para a atividade antioxidante dos extratos antociânicos no ensaio do DPPH. Não foi possível identificar o composto responsável pela atividade antioxidante no ensaio de TBARS. Nossos resultados revelaram que as seleções de amora desenvolvidas pela Embrapa, especialmente a seleção 02/96, parecem ter maior atividade antioxidante do que as cultivares comerciais produzidas no sul do Brasil. Assim, essa seleção parece ser promissora para fins nutricionais e de saúde. Além disso, os genótipos de amora-preta avaliados apresentaram bom valor nutricional com conteúdo de açúcar e acidez ideais para a industrialização, e contém ácidos graxos importantes para a manutenção da saúde.

**Palavras-chave:** valor nutricional, atividade antioxidante, amora-preta, *Rubus sp.*, compostos bioativos

## **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Graduate Program in Food Science and Technology  
Federal University of Santa Maria

### **NUTRITIONAL VALUE AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF DIFFERENT GENOTYPES OF BLACKBERRY (*Rubus sp.*)**

**AUTHOR: GABRIELA ELISA HIRSCH**  
**ADVISOR: TATIANA EMANUELLI.**  
**CO-ADVISOR: ELIZETE MARIA PESAMOSCA FACCO**  
Date and Defense place: Santa Maria, February 4<sup>th</sup>, 2010.

Rio Grande do Sul is among the major blackberry (*Rubus sp.*) producer states from Brazil, but studies evaluating this fruit in Brazil are scarce. Thus, this study was aimed at determining the nutritional characteristics and bioactive compounds of different blackberry genotypes from Rio Grande do Sul, as well as their antioxidant capacity. The blackberry genotypes (selections 07/001, 03/001, 02/96 and 99 and cultivars Guarani, Cherokee, Tupy and Xavante) evaluated were cultivated at Embrapa Temperate Climate (Pelotas, RS, Brazil, 31°40'47''S, 52°26'24''W, 60 m). The fruits had 84.8 - 90.3% humidity, 0.09 - 0.14% protein, 5.8 - 5.5% dietary fiber and 0.27 - 0.49% ash. Selection 02/96 had the lowest ash content. TSS ranged from 7.3 to 10.2 °Brix, acidity ranged between 1.30 and 1.58% citric acid and pH between 2.8 and 3.1. Selection 03/001 had the lowest TSS value and it also had lower redness, but higher color saturation than Tupy cultivar. Selection 03/001 showed more intense and brighter color than the other genotypes. The fatty acids found at higher concentration were palmitic (22-29%), oleic (13-32%) and linoleic (15-33%) acids, with small differences among the blackberry genotypes. Four different antioxidant assays were conducted to assess the antioxidant activity of both phenolic and anthocyanic fruit extracts. Regarding the phenolic extracts, selections 02/96 and 07/001 had higher antioxidant activity than the cultivars in most assays, and this activity was partially correlated to the higher amount of total phenolics in these samples. Thus, the phenolic compounds are probably the major responsible for the antioxidant activity in the diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging assay (DPPH), ferric-reducing antioxidant power assay (FRAP) and thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS). Quercetin seems to be responsible for the



antioxidant activity of blackberry phenolic extracts in the  $\beta$ -carotene bleaching assay. Concerning the anthocyanic extracts, selection 02/96 and Tupy and Cherokee cultivars from harvest 2007 had higher antioxidant activity than the other genotypes in most assays. Anthocyanins appear to be the major responsible for the antioxidant activity of anthocyanic extracts in the DPPH and FRAP assays, although ascorbic acid also contributed to the DPPH antioxidant activity. It was not possible to identify the compound responsible for the TBARS antioxidant activity of anthocyanic extracts. Our results revealed that the new blackberry selections developed by Embrapa, especially selection 02/96 appears to have higher antioxidant activity than the commercial cultivars cultivated in the southern Brazil. Thus, this selection appears to be promising for nutritional and health purposes. Furthermore, the blackberry genotypes evaluated had good nutritional value with sugar and acidity levels suitable for industrialization, and they contain fatty acids important for maintaining health.

**Keywords:** nutritional value, antioxidant activity, blackberry, *Rubus sp.*, bioactive compounds

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO 1

<b>TABELA 1</b> - Composição, acidez, pH e sólidos solúveis totais das amostras de amora-preta ( <i>Rubus sp.</i> ).....	45
<b>TABELA 2</b> - Parâmetros de cor das amostras de amora-preta ( <i>Rubus sp.</i> ).....	46
<b>TABELA 3</b> - Composição dos ácidos graxos de amostras de amora-preta ( <i>Rubus sp.</i> )	47

### MANUSCRITO 2

<b>TABLE 1</b> – Antioxidant activity of blackberry phenolic extracts .....	75
<b>TABLE 2</b> - Composition of blackberry phenolic extracts .....	76
<b>TABLE 3</b> - Antioxidant activity of blackberry anthocyanin extracts .....	77
<b>TABLE 4</b> - Composition of blackberry anthocyanic extracts .....	78

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> - Amoreira-preta ( <i>Rubus sp.</i> ) e seus frutos.....	18
<b>FIGURA 2</b> - Estruturas básicas de compostos fenólicos não flavonóides e flavonóides.....	23
<b>FIGURA 3</b> - Estrutura geral das antocianinas com exemplos de substituintes que originam estruturas químicas de antocianidinas e antocianinas.....	25
<b>FIGURA 4</b> - Reação de Fenton.....	27

### MANUSCRITO 2

<b>FIGURE 1</b> - Inhibition of betacarotene bleaching (A) and lipid oxidation in fish homogenate (B) by blackberry phenolic extracts.....	80
<b>FIGURE 2</b> - Inhibition of lipid oxidation in fish homogenate by blackberry anthocyanic extracts.....	81

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**a\*** - Intensidade de vermelho

**ANOVA** - Análise de variância

**b\*** - Intensidade de amarelo

**L\*** - Luminosidade da amostra

**H** - Ângulo de matiz

**STT**- Sólidos solúveis totais

**pH** - Potencial hidrogeniônico

**TBARS** - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**DPPH** - 2,2-Difenil-1-picrilhidrazila

**FRAP** - Poder antioxidante de redução do ferro

**DAD** - Detector de arranjo de diodos

**LOQ** - Limite de quantificação

**LOD** - Limite de detecção

**TPTZ** - 2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazina

**HPLC**- Cromatografia líquida de alta eficiência

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Fotografias de algumas variedades de amoras-pretas utilizadas no experimento.....	100
--	-----

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE APÊNDICES .....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Amora-preta (<i>Rubus sp.</i>) .....</b>	<b>17</b>
3.1.1 Benefícios à saúde .....	20
3.1.2 Produção no Brasil .....	21
<b>3.2 Compostos bioativos .....</b>	<b>22</b>
3.2.1 Compostos fenólicos .....	22
3.2.1.1 Antocianinas .....	24
3.2.2 Ácido ascórbico .....	26
<b>3.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e as alterações oxidativas .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 Antioxidantes .....</b>	<b>28</b>
3.4.1 Avaliação da capacidade antioxidante .....	29
<b>4. ARTIGOS CIENTÍFICOS .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Manuscrito 1 – Caracterização físico-química de variedades de amora-preta da região sul do Brasil .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Manuscrito 2 - Antioxidant activity of blackberry (<i>Rubus sp.</i>) genotypes from southern Brazil .....</b>	<b>48</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE A -Fotografias de algumas variedades de amoras-pretas utilizadas no experimento.....</b>	<b>100</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A alimentação equilibrada tem um papel importante na manutenção da saúde (PROSKY, 2001). Assim, há uma procura cada vez maior por alimentos que satisfaçam às necessidades nutricionais básicas ou que desempenhem efeitos fisiológicos benéficos à saúde do consumidor, o que gerou um aumento dos esforços da comunidade científica que tem produzido inúmeros estudos com o intuito de comprovar a atuação de certos alimentos na prevenção de doenças e de conhecer seu valor nutricional (THAMER e PENNA, 2006).

Além de seu sabor delicioso e aroma refrescante, os frutos são fonte de importantes vitaminas, minerais e outros compostos bioativos na dieta humana. A amoreira-preta apresenta frutas de alta qualidade nutricional e valor econômico significativo (ANTUNES, 2002), que são ricas em vitamina C e água, contém cerca de 10% de carboidratos, elevado conteúdo de minerais, vitaminas do complexo B e A, além de ser fonte de compostos funcionais. As frutas de amora-preta são boas fontes de antioxidantes naturais (KOCA e KARADENIZ, 2009), como as antocianinas (DEIGHTON et al., 2000) e os polifenóis (WANG e LIN, 2000; MOYER et al., 2002). Tem-se demonstrado que as amoras-pretas contêm maiores quantidades de antocianinas e outros antioxidantes que outras frutas (HALVORSEN et al., 2006; MOYER et al., 2002; PANTELIDIS et al., 2007). Também são ricas em fibras e ácido fólico (ANTUNES et al., 2002; MORENO-ALVAREZ et al., 2002). As frutas da amoreira contem ainda ácidos graxos essenciais (ácidos poliinsaturados de cadeia longa), como o linoléico e o linolênico e seus derivados, que os seres humanos não podem sintetizar. Esses compostos devem ser obtidos através da dieta e são importantes para regular várias funções do corpo, incluindo pressão arterial, viscosidade sanguínea, imunidade, resposta inflamatória (PAWLOSKY, WARD e SALEM, 1996; SIMOPOULOS e SALEM, 1996).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que existe uma correlação entre o consumo de frutas e a redução de doenças crônicas (CHUN e KIM, 2004; KUSKOSKI, ASUERO e TRONCOSO, 2005; WU et al., 2004). A combinação de vitaminas, minerais, antioxidantes fenólicos e de fibras parece ser responsável por esses efeitos (RUXTON, GARDNER e WALKER, 2006).

A amora-preta já é considerada uma fruta funcional, ou seja, além das características nutricionais básicas, quando consumida como parte usual da dieta, produz efeito fisiológico/metabólico ou efeito benéfico à saúde humana, sendo segura para consumo sem supervisão médica (VIZZOTO, 2008). Um dos compostos associados a essa atividade é o ácido elágico (WANG et al., 1994). Segundo WANG et al. (1994), ele está presente na amora-preta e possui funções anti-mutagênica e anticancerígena, além de ser um potente inibidor da indução química do câncer (MAAS, GALLETTA e STONER, 1991).

Assim, a amora-preta (*Rubus sp.*) vem despertando interesse de produtores e consumidores, principalmente pelo potencial de consumo associado às suas propriedades benéficas à saúde. No entanto, existem poucas pesquisas sobre seu valor nutricional e potencial industrial (HARBONE e WILLIAMS, 2000), especialmente no Brasil. Neste país, a cultura da amora foi introduzida na década de 70 pelo Instituto Brasileiro de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Clima Temperado (ANTUNES, 2002). Posteriormente, a Embrapa passou a conduzir um programa de melhoramento genético que desenvolveu diversas cultivares de amoras adaptadas à região sul do Brasil, incluindo Guarani, Caingangue, Xavante e Tupy. Devido às características climáticas adequadas (clima temperado), o Rio Grande do Sul foi o primeiro estado do Brasil a produzir amoras e ainda é o principal produtor (ANTUNES, 2002).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente projeto tem como objetivo geral investigar o valor nutricional e a capacidade antioxidante de diferentes variedades de amora-preta (*Rubus sp.*), que estão sendo produzidas na Embrapa Clima Temperado, em Pelotas (RS).

### **2.2 Objetivos específicos**



- Determinar os principais componentes nutricionais e características físico-químicas dos diferentes genótipos de amora-preta;
- Determinar a composição e o conteúdo de compostos bioativos, bem como a capacidade antioxidante dos diferentes genótipos da amora-preta;
- Avaliar a influência de fatores climáticos sobre os compostos bioativos e a atividade antioxidante de amoras-pretas da cultivar Cherokee obtidas em duas safras diferentes (2007 e 2009).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Amora-preta (*Rubus sp.*)

A amoreira-preta pertence à família *Rosaceae* (ANTUNES, 2002) e é classificada no gênero *Rubus*, subgênero *Eubatus*, constituindo um grupo variado e complexo de plantas (MOORE, 1984; POLING, 1996). É uma espécie arbustiva de porte ereto ou rasteiro (Figura 1) (FACHINELLO et al., 1994). Os frutos da amoreira-preta são agregados, pesando cerca de 4 a 7 gramas, de coloração negra (Figura 1) e sabor ácido a doce-ácido (FACHINELLO et al., 1994). O fruto verdadeiro da amoreira é denominado de mini drupa ou drupete, no qual existe uma pequena semente, sendo que a sua junção forma o que é chamado de fruto agregado (POLING, 1996). Seus frutos são ricos em compostos funcionais, como ácido elágico e antocianinas (ANTUNES et al., 2002).

Estudos realizados por Wang e Lin (2000) em frutos e folhas de amora-preta cultivada no Centro de Pesquisas de Agricultura de Beltsville, nos Estados Unidos, indicaram que seus frutos maduros constituem fonte rica em antocianinas.



**Figura 1.** Amoreira-preta (*Rubus sp.*) e seus frutos. Fonte: adaptado de Antunes e Raseira (2004)

Além dos compostos bioativos, estudos realizados por Antunes (2002) com amostras de amora-preta obtidas em Caldas, Minas Gerais, demonstraram que a fruta fresca é altamente nutritiva sendo rica em minerais (fósforo, potássio, magnésio, ferro, selênio) (TONSUN, USTUN e TEKGULER, 2004), pró-vitamina A, vitamina B e cálcio, além de ser rica em fibras e ácido fólico (ANTUNES, REGINA e DUARTE-FILHO, 2002; MORENO-ALVAREZ et al., 2002). Porém, a amora é uma fruta de baixo valor calórico, apenas 52 calorias em 100 gramas de fruta (VIZZOTTO, 2008).

O cultivo de amoras se tornou popular nos Estados Unidos após o ano de 1840 e as cultivares de amoras utilizadas no Brasil são o resultado de introduções, hibridações e

seleções de cultivares americanas. Embora existam espécies nativas do gênero *Rubus*, no Brasil, a amoreira-preta só começou a ser pesquisada em 1972 pela EMBRAPA Clima Temperado, então Estação Experimental de Pelotas, sendo a primeira coleção implantada em 1974 no município de Canguçu (RS). A partir de 1975, a Embrapa Clima Temperado (Pelotas – RS) vem desenvolvendo um programa de melhoramento genético da amora-preta buscando melhorar a qualidade e produtividade das frutas, bem como gerar melhores adaptações para o cultivo da amoreira-preta. A amoreira-preta é uma planta que se adapta bem em regiões com temperaturas moderadas no verão, sem intensidade luminosa elevada, chuva adequada, pois necessita de disponibilidade regular de água, porém, não deve haver excesso durante o período de frutificação, e temperaturas baixas no inverno (abaixo de 7,2°C), suficientes para atender à necessidade de frio da planta. Diferente das demais espécies de pequenas frutas, ela apresenta cultivares com boa adaptação às condições climáticas do Sul do Brasil, desenvolvidas através de melhoramento genético na Embrapa, em Pelotas - RS, a partir de cultivares que apresentam adaptação a altas temperaturas no verão e menor necessidade de horas de frio no inverno (ANTUNES e RASEIRA, 2004).

Dos trabalhos de melhoramento e introdução resultaram várias cultivares, com características para industrialização e/ou para o consumo *in natura*. A cultivar Guarani foi selecionada no Brasil a partir de cruzamento realizado nos EUA (Arkansas) entre as variedades ‘Lawton’ x (‘Darrow’ x ‘Brazos’) x (‘Shaffer Tree’ x ‘Brazos’), e é recomendada para o consumo *in natura* e industrialização (SANTOS e RASEIRA, 1988). A cultivar Tupy é resultado do cruzamento entre as cultivares ‘Uruguai’ x ‘Comanche’, realizado na EMBRAPA Clima Temperado em 1982. Produz frutas grandes (6 gramas), coloração preta e uniforme, sabor equilibrado em acidez e açúcar, consistência firme, semente pequena, película resistente e aroma ativo. É recomendada para o consumo *in natura* pelo fato de apresentar baixa acidez (SANTOS e RASEIRA, 1988). Já a cultivar Cherokee é originária do cruzamento de ‘Darrow’ x ‘Brazos’, realizado em 1965, foi selecionada em 1968 e lançada como cultivar em 1974. Suas frutas são de tamanho médio (4 a 5 g), firmes e de sabor levemente ácido, e porte ereto (MOORE et al., 1984; RASEIRA, SANTOS e MADAIL, 1984). Pode ser congelada e usada na forma de conservas (BROOKS e OLMO, 1997). A cultivar Xavante foi lançada pela Embrapa Clima Temperado em conjunto com a Universidade de Arkansas e é a segunda geração do cruzamento entre as seleções A 1620 e A 1507. É uma cultivar que necessita pouco frio e tem boa produção. Suas frutas têm forma alongada, firmeza média, peso médio de 6 g e sabor doce-ácido (ANTUNES e RASEIRA, 2004).

### 3.1.1 Benefícios à saúde

Vários compostos lipofílicos e hidrofílicos são encontrados em frutas vermelhas, cujas propriedades biológicas têm sido atribuídas aos altos níveis e ampla diversidade de compostos fenólicos. Porém, acredita-se que o efeito complementar, aditivo e/ou, sinérgico resultante dos diversos componentes seja o responsável pelas propriedades biológicas benéficas ao invés de uma única classe ou composto químico (FERREIRA, ROSSO e MERCADANTE, 2010).

Destacam-se entre os compostos fenólicos presentes na amora-preta os pigmentos naturais antocianinas. O efeito protetor destes compostos tem sido relacionado ao seu poder antioxidante, pois os compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, possuem a capacidade de doar hidrogênios ou elétrons aos radicais livres (RICE-EVANS et al., 1996).

Foram encontrados teores de antocianinas de 70 a 201 mg/100 g de peso fresco em 18 diferentes cultivares de amoras-pretas (*Rubus* spp.) dos Estados Unidos, França, Macedônia, Chile e México (FAN-CHIANG e WROLSTAD, 2005). As antocianinas apresentam efeitos fisiológicos capazes de reduzir o risco de doenças (LIMA e GUERRA, 2003). Muitos estudos sugerem que flavonóides exibem várias atividades biológicas, incluindo antialérgica, anti-viral, anti-tumoral, ações antiinflamatórias e antioxidantes (HARBONE, 1998). As antocianinas possuem diversos efeitos *in vitro* que sugerem benefícios potenciais à saúde em geral e redução de doenças coronarianas, em particular (MAZZA, 2007). Os mecanismos primários creditados como responsáveis pela redução no risco de doenças coronarianas incluem a redução de coagulação plaquetária (ELWOOD et al, 1991) e o aumento circulatório da lipoproteína de alta-densidade (HDL) (GRAZIANO et al., 1993), além da atividade removedora de radicais livres (antioxidante) (BOORS e SARAN, 1987).

Outro composto comum na amora-preta é o ácido elágico, um constituinte fenólico da fruta (WANG et al., 1994), derivado do ácido gálico, que possui funções antimutagênica e anticancerígena, sendo um potente inibidor da indução química do câncer (MAAS et al., 1992).

Além disso, são atribuídas às frutas da amoreira-preta outras propriedades, como o controle de hemorragias em animais e seres humanos, controle da pressão arterial e efeito sedativo, complexação de metais, função antioxidante, ação contra crescimento e alimentação de insetos (BHARGAVA et al., 1968, CLIFFTON, 1967, GIROLAMI et al., 1966; *apud* MAAS, GALLETTA e STONER, 1991).

### 3.1.2 Produção no Brasil

Apesar de ser uma planta nativa da Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul, a amoreira-preta cresce apenas em regiões determinadas de acordo com o clima ideal para o seu desenvolvimento (ANTUNES, 2002). A maioria das espécies de amora-preta não se desenvolve bem em regiões com inverno ameno (MOORE, 1984). No Brasil, a cultura da amora-preta foi introduzida pela Estação Experimental de Pelotas, atual Embrapa Clima Temperado, no Rio Grande do Sul, na década de 70, e desde então seu cultivo vem crescendo nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, com a introdução e adaptação de novas cultivares (ANTUNES, 2002).

O estado do Rio Grande do Sul é o pioneiro na produção de amora-preta e o maior produtor, com cerca de 700 toneladas por ano (LORENZI et al., 2006). Este estado é considerado o principal produtor brasileiro de amora-preta e as maiores produções encontram-se nos municípios de Feliz e Vacaria, onde a cultivar Tupy responde por 70% da área cultivada, com produção a partir da terceira dezena de novembro (ANTUNES, 1999; 2002). Estes cultivos, em sua maioria, são em pequenas propriedades (ANTUNES, 2005), pois é uma planta rústica que apresenta baixo custo de produção, facilidade de manejo, requer pouca utilização de defensivos agrícolas, sendo, por isso, uma alternativa interessante para cultivo na agricultura familiar (ANTUNES, 2002).

No Brasil, estima-se que existam 300 ha plantados desta rosácea no sul de Minas, região de Jundiá em São Paulo, Curitiba e Palmas no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Estes cultivos, em sua maioria, são em pequenas propriedades. A fruta fresca tem grande mercado. Em algumas regiões, como as de Pelotas, Antônio Prado e Vacaria (RS), pequenas cooperativas já transformam a produção em geléias e sucos (ANTUNES, 2005). A produção de amora-preta no Brasil estende-se de outubro a fevereiro, não havendo oferta interna do produto fora deste intervalo (ANTUNES et al., 2006).

Segundo o Engenheiro Agrônomo Eduardo Pagot da Associação dos Produtores de Pequenas Frutas de Vacaria, praticamente 100% da produção de amora-preta é destinada ao mercado da indústria e parte da fruta é colocada no mercado “*in natura*” e exportada em pequenos volumes para países europeus, na ocasião da entressafra daqueles países.

A aceitação desta fruteira, pelos produtores, levou a Embrapa Clima Temperado a desenvolver um Programa de Melhoramento Genético que deu origem a diversas cultivares mais adaptadas às condições de solo e de clima da região (GRANADA, VENDRUSCOLO e TREPTOW, 2001), tendo lançado as cultivares Ébano, em 1981, Tupy, em 1988, Guarani, em 1988, e Xavante, em 2004. Nesse período, também foram introduzidas as cultivares Brazos, da Universidade Texas A&M, a ‘Comanche’ e a ‘Cherokee’ da Universidade de Arkansas (SANTOS et al., 1997).

### **3.2 Compostos bioativos**

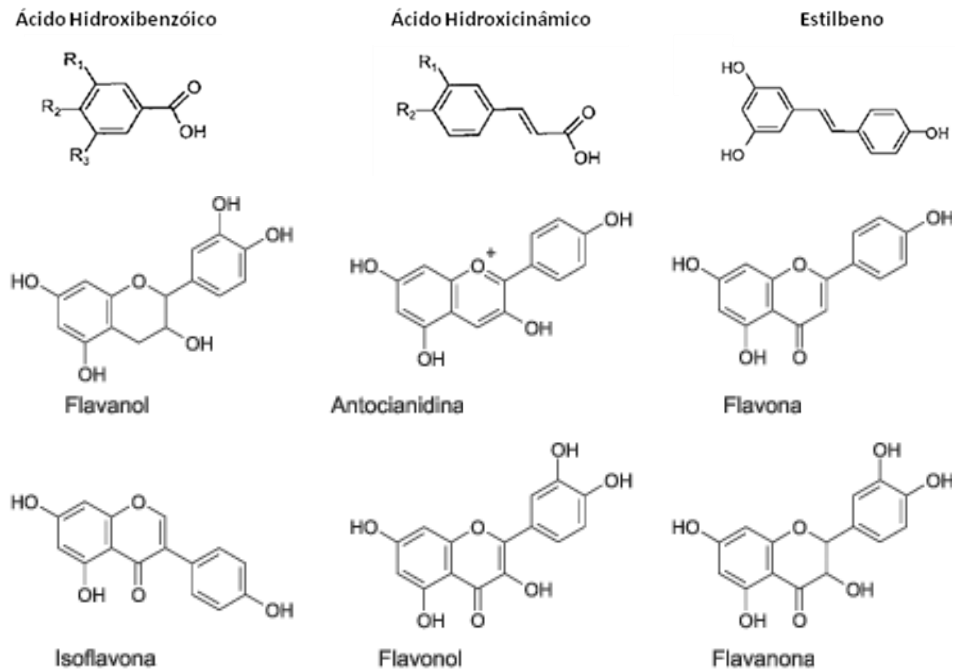
Muitos estudos têm mostrado que o consumo de frutas e vegetais pode exercer efeitos positivos sobre a saúde humana. Este achado está intimamente relacionado ao fato de que os frutos, reconhecidos por conter nutrientes essenciais e uma série de micronutrientes tais como minerais, fibras e vitaminas, representam excelentes fontes dos chamados compostos bioativos. Compostos bioativos são constituintes extranutricionais, naturalmente presentes em pequenas quantidades nos alimentos, que exibem potente atividade biológica (COZZOLINO, 2009). Dentre estes, destacam-se os compostos antioxidantes da dieta como os polifenóis, vitaminas C e E e carotenóides (SAURA-CALIXTO e GONI, 2006). Esses antioxidantes naturais ocorrem em todas as partes das plantas (LARSON, 1988).

As atividades biológicas das frutas vermelhas, como a amora-preta, são parcialmente atribuídas ao seu elevado teor de uma variada gama de fitoquímicos como os flavonóides (antocianinas, flavonóis, e flavanóis), taninos (proantocianidinas, elagitaninos e galotaninos), estilbenóides (como o resveratrol), ácidos fenólicos (derivados do ácido hidroxibenzóico e hidroxicinâmicos) e lignanas (SEERAM, 2006).

#### **3.2.1 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Esses compostos químicos pertencem a um grupo heterogêneo com aproximadamente 10.000 compostos

(HERMANN e WEAVER, 1999). Podem ser divididos em dois grandes grupos: os flavonóides, subdivididos em flavonas, flavanóis, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas, e os não flavonóides, que compreendem os grupos dos ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (Figura 2) (LI et al., 2009).



**Figura 2.** Estruturas básicas de compostos fenólicos não flavonóides e flavonóides.

Fonte: Adaptado de Manach et al. (2005).

Os polifenóis são metabólitos secundários naturalmente presentes em frutas e hortaliças, sendo que as frutas vermelhas, especialmente as frutas de amora-preta, são importantes fontes desses compostos na alimentação humana (SELLAPPAN, AKOH e KREWER, 2002; ZHENG e WANG, 2003). Os compostos fenólicos são formados pelas plantas em condições de estresse como infecções, ferimentos, exposição a radiações UV, dentre outros (NACZK e SHAHIDI, 2006), protegendo contra patógenos e predadores (BRAVO, 1998).

A importância dos polifenóis na nutrição humana, geralmente está relacionada à promoção da saúde e possível prevenção de algumas doenças (GIBNEY, MACDONALD e ROCHE, 2006). Dentre os seus efeitos potencialmente benéficos a saúde destacam-se atividade antiinflamatória, antiviral, antimicrobiana e antioxidante (NARAYANA et al., 2001; LIU, 2003).



A atividade antioxidante desses compostos é principalmente devido às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um papel importante na absorção e neutralização de radicais livres, removendo o oxigênio tripleto e singleto ou decompondo peróxidos (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). Sua capacidade antioxidante é relacionada, também, à presença de grupos hidroxila em sua estrutura química e à alta reatividade dos mesmos, fatores considerados críticos para a neutralização de radicais livres (ELISIA et al., 2007).

Os compostos fenólicos são instáveis podendo sofrer degradação durante as diversas etapas do processamento, armazenamento e estocagem de alimentos (ELISIA et al., 2007).

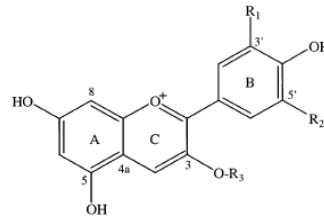
### 3.2.1.1 Antocianinas

As antocianinas são um grupo de compostos fenólicos de ocorrência natural responsáveis pela cor de muitas plantas, flores e frutas (MARKAKIS, 1982). Já as antocianidinas são as agliconas dos compostos encontrados na natureza na forma *O*-glicosilada, e assim chamados antocianinas (FRANCIS, 1989). Há uma variedade enorme de antocianinas espalhadas na natureza e as principais diferenças entre elas são o número de grupos hidroxilados, a natureza e o número de açúcares ligados a sua estrutura, os carboxilatos alifáticos ou aromáticos ligados ao açúcar na molécula e a posição dessas ligações (Figura 3) (KONG et al., 2003). Até agora, há relatos de mais de 500 antocianinas diferentes (ANDERSEN e JORDHEIM, 2006) e 23 antocianidinas (ANDERSEN e JORDHEIM, 2006; KONG et al, 2003; REIN, 2005) das quais seis são as mais comuns nas plantas, sendo elas a pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina e delphinidina (CLIFFORD, 2000), e as três últimas são as mais comuns na natureza (DEY e HARBONE, 1993).

As antocianinas e antocianidinas têm mostrado atividade antioxidante superior às vitaminas C e E (BAGCHI et al., 1998). Esses compostos têm capacidade de neutralizar radicais livres por doação de átomos de hidrogênio (CHEN et al., 1996; RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996). Vários estudos têm sugerido que o teor de antocianinas e sua correspondente atividade antioxidante contribuem para o efeito protetor das frutas e dos legumes contra doenças degenerativas e crônicas (HEINONEN, MEYER e FRANKEL, 1998;



RECORD, DREOSTI e McINERMEY, 2001). Esses compostos também apresentam vários outros potenciais benefícios para saúde como redução do risco de doenças cardiovasculares (RENAUD e LORGERIL, 1992), melhora da visão (MATSUMOTO et al., 2003) e atividades anti-carcinogênica (BOMSER et al., 1996; KAMEI et al., 1995) e anti-inflamatória (WANG e MAZZA, 2002).



ANTOCIANIDINAS E ANTOCIANINAS	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Pelargonidina	H	H	H
Cianidina	OH	H	H
Delfinidina	OH	OH	H
Peonidina	OMe	OH	H
Malvidina	OMe	OMe	H
Pelargonidina-3-galactosídeo	H	H	galactose
Cianidina-3-galactosídeo	OH	H	galactose
Cianidina-3-rutinosídeo	OH	OH	rutinose
Cianidina-3-glicosilrutinosídeo	OH	OH	glicose-rutinose
Delfinidina-3-galactosídeo	OH	OH	galactose

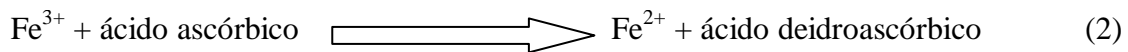
**Figura 3.** Estrutura geral das antocianinas com exemplos de substituintes que originam estruturas químicas de antocianidinas e antocianinas. Fonte: Seeram e Nair (2002).

As antocianinas normalmente são estáveis sob condições ácidas, porém podem se degradar por qualquer mecanismo que leve à formação de compostos escuros e/ou insolúveis (JACKMAN e SMITH, 1992). Essa degradação pode ocorrer durante o processamento e/ou armazenamento do alimento, sendo que os fatores de maior influência são pH, temperatura, presença de oxigênio e enzimas, além da interação com outros componentes do alimento como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e co-pigmentos (BOBBIO e BOBBIO, 1992, JACKMAN e SMITH, 1992).

### 3.2.2 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico está presente em quase todos os alimentos de origem vegetal. É um micronutriente essencial para o homem e a exigência mínima de ácido ascórbico para o ser humano é definida como 40-60 mg/dia (LEVINE et al., 1995). É uma vitamina hidrossolúvel e antioxidante que reage diretamente com o oxigênio simples, radical hidroxila e radical superóxido, além de regenerar a vitamina E. Além disto, esta vitamina mantém as enzimas sulfidrílicas em seus estados reduzidos e poupa a glutathiona peroxidase, que é um importante antioxidante intracelular e cofator enzimático (CARR e FREI, 1999). O ácido ascórbico desempenha várias funções no metabolismo, dentre eles, destacam-se o aumento da resistência orgânica e a formação do colágeno, é ativador de crescimento, interfere no metabolismo do ferro, da glicose e na saúde dos dentes e gengivas, além de possuir potente atividade antioxidante (FRANCO, 1992; WINTON e WINTON, 1958). O seu teor é influenciado pelo tipo de solo, forma de cultivo, condições climáticas, procedimentos agrícolas para colheita e armazenamento (BADOLATO et al., 1996, SOUZA FILHO et al., 1999). Além disso, o ácido ascórbico é facilmente destruído por oxidação, particularmente na presença de calor, alcalinidade, catalisadores metálicos, danos físicos e baixa umidade relativa (LEE e KADER, 2000; GIANNAKOUREOU e TAOUKIS, 2003).

Apesar de ser amplamente conhecido por sua atividade antioxidante, em algumas condições o ácido ascórbico pode apresentar características pró-oxidantes, pois após doar seus dois hidrogênios redutores, fica passível de receber elétrons, devido ao radical ascorbila formado, que é um agente oxidante (BORS e BUETTNER, 1997). Assim, baixas concentrações de ascorbato aumentam a atividade dos radicais de oxigênio, enquanto que altas concentrações de ascorbato atuam seqüestrando radicais hidroxila, oxigênio singlete e peróxidos (SAKAGAMI et al, 2000). Uma atividade pró-oxidante do ácido ascórbico também foi relatada in vitro na presença de traços de metais de transição, como ferro e/ou cobre. Nestas condições a ação redutora do ácido ascórbico sobre estes metais funciona como um catalizador para a formação de radical hidroxil através da reação de Fenton (Figura 4; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).



**Figura 4.** Reação de Fenton. (1) Formação de radicais hidroxil a partir do peróxido de hidrogênio na presença de ferro reduzido. (2) Regeneração do ferro reduzido pela ação do ácido ascórbico. Fonte: adaptado de Halliwell e Gutteridge (2007).

### 3.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e as alterações oxidativas

Espécies reativas de oxigênio são produzidas naturalmente no organismo de mamíferos, como resultado do metabolismo oxidativo (RAHMAN e ADCOCK, 2006). Sua formação ocorre pela ação de enzimas, durante processos fisiológicos (produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes) e pela exposição a fatores exógenos, tais como: ozônio, radiação gama e ultravioleta, dieta, uso de medicamentos e tabagismo (CERUTI, 1991; HUSAIN, CILLARD e CILLARD, 1987). No entanto, são observadas situações nas quais ocorre uma sobrecarga dos mecanismos antioxidantes e o excesso dos radicais livres acumulados apresenta efeitos prejudiciais (FINKEL e HOLBROOK, 2000; HUSAIN, CILLARD e CILLARD, 1987; SCHAFER e BUETTNER, 2001), pois pode causar danos oxidativos em diferentes moléculas (lipídios, proteínas e ácidos nucleicos). O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, potencialmente levando a danos e tem sido sugerido como causa do envelhecimento e de várias doenças nos seres humanos (KATALINIC et al., 2006). As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na fase de iniciação de diversas doenças degenerativas (CERQUEIRA, MEDEIROS e AUGUSTO, 2007), como, por exemplo, dano nas membranas e DNA, propiciando mutações que podem causar carcinogênese, e oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que é considerado um dos principais fatores causadores de doenças cardiovasculares (RAHMAN e ADCOCK, 2006).

### 3.4 Antioxidantes

A maioria das espécies animais possui um sistema eficiente de proteção, sendo assim capaz de neutralizar os efeitos prejudiciais decorrentes do metabolismo do oxigênio e da oxidação de lipídios (CERUTI, 1991). Para se defender das espécies reativas de oxigênio (EROs), o organismo apresenta mecanismos de defesa em três níveis distintos: prevenção da formação de EROs, eliminação das EROs formadas e reparo de moléculas modificadas pelas EROs (SIES, 1993). Os compostos antioxidantes atuam na prevenção e eliminação das EROs formadas.

Os organismos eucariotos possuem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo (TRABER, 1997). Esses compostos são conhecidos como antioxidantes enzimáticos (BABIOR, 1997).

Participam também do sistema de defesa antioxidante do organismo os chamados antioxidantes não enzimáticos, formados por muitas substâncias como o ácido úrico e proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina). Além destes, se destacam os antioxidantes não-enzimáticos obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, além dos flavonóides e carotenóides, que são extremamente importantes na intercepção dos radicais livres (VASCONCELOS et al., 2007; BIANCHI e ANTUNES, 1999). Os antioxidantes não-enzimáticos protegem os alvos biológicos da oxidação por apresentarem capacidade de supressão da formação de radicais livres (quelação de metais ou inibição de enzimas geradoras de radicais livres), eliminação de radicais livres ou desativação formando um produto estável e/ou participação em processos de reparo (BOURNE e RICE-EVANS, 1999). As lesões causadas pelos radicais livres nas células podem ser prevenidas ou reduzidas por meio da atividade de antioxidantes, sendo estes encontrados em muitos alimentos (PAPAS, 1999).

Segundo Reynertson et al. (2008) a defesa inata do corpo humano pode não ser suficiente para neutralizar danos oxidativos, e uma proteção adicional é crítica para a prevenção de doenças. Isso torna os antioxidantes obtidos pela dieta indispensáveis para a defesa do organismo e manutenção da saúde (CERQUEIRA et al., 2007).

O crescente conhecimento sobre o impacto gerado por antioxidantes da dieta na promoção da saúde tem levado a um aumento nas investigações no campo de antioxidantes

naturais (ABDALLA e ROOZEN, 1999; MOLYNEUX, 2004). Os fitoquímicos encontrados naturalmente em frutas e hortaliças apresentam efeitos antioxidantes, sendo que muitos destes compostos são encontrados na amora-preta, como os ácidos fenólicos (ácido gálico, hidroxibenzóico, caféico, cumárico, ferúlico e elágico) e seus derivados, os flavonóides (catequina, epicatequina, miricetina, quercetina e campferol) (SELLAPPAN, AKOH e KREWER, 2002), além de ácido ascórbico (HASSIMOTO et al., 2008).

#### 3.4.1 Avaliação da capacidade antioxidante

Por definição, atividade antioxidante é a capacidade que um composto (composição) tem de inibir a degeneração oxidativa (ROGINSKY e LISSI, 2005) e um grande número de métodos tem sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante dos alimentos. Contudo, devido à complexidade da composição de cada tipo de alimento, tendo em vista que os antioxidantes não atuam separadamente, a possível interação entre eles pode fazer com que a determinação da capacidade antioxidante individualmente seja menos efetiva do que o estatus antioxidante total (PRIOR e CAO, 1999). Logo, são numerosas as metodologias para a determinação da capacidade antioxidante e podem estar sujeitas a interferências, sendo necessário o emprego de duas ou mais técnicas, pois nenhum método sozinho poderia refletir exatamente a capacidade antioxidante total de uma amostra (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

O método DPPH (ensaio de remoção do radical 2,2 difenil-1-picrilidrazila) é o mais antigo método indireto para a determinação da capacidade antioxidante. É usado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos individuais e alimentares, bem como amostras biológicas relevantes. O teste de DPPH (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995) baseia-se na redução do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil na presença de um antioxidante doador de hidrogênio, incluindo compostos fenólicos. Como o DPPH mostra uma absorção muito intensa na região do visível, pode ser facilmente determinado por espectrofotometria (ROGINKI e LISSI, 2005). Este método tem sido considerado um dos mais representativos para o emprego em modelos de radicais na avaliação da capacidade de remoção de radicais livres (GENOVESE et al., 2008). Porém, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Além disso, o radical

livre formado e sintético. Dessa forma, a atividade antioxidante sobre radicais livres biológicos pode não ser a mesma avaliada neste método.

O método FRAP (poder antioxidante de redução do ferro) (BENZIE e STRAIN, 1996) é baseado na habilidade de redução do  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ , em pH baixo. Quando isso ocorre na presença de 2,4,6-tripiridil-*s*-triazina (TPTZ), a redução é acompanhada pela formação de um complexo ( $\text{Fe}^{2+}$  – TPTZ) de cor azul intensa que pode ser monitorado a 593 nm. É um método barato, os reagentes são de fácil preparo, os resultados são altamente reprodutíveis, e o procedimento é simples e rápido (BENZIE e STRAIN, 1996). Porém, a medida da capacidade de redução não reflete necessariamente a capacidade antioxidante (FRANKEL e MEYER, 2000). Nem todo redutor que tem habilidade de reduzir o ferro é antioxidante e nem todo antioxidante é capaz de reduzir o ferro (ex.: glutatona) (PRIOR et al., 2003). Além disso, já que este método não inclui nenhum substrato oxidável, ele não fornece informações sobre as propriedades protetoras dos antioxidantes (FRANKEL e MEYER, 2000).

O método de TBARS (ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) se tornou um dos ensaios mais populares para estudos relacionados a peroxidação lipídica, e ainda hoje é amplamente utilizado para avaliar as atividades antioxidante de vários produtos naturais (SMET et al., 2008). Neste método são avaliados produtos secundários da oxidação lipídica, formados pela decomposição dos hidroperóxidos (BUEGE e AUST, 1979). Para medir a capacidade de inibição da oxidação lipídica, um substrato é oxidado na presença de um íon metálico de transição e a extensão da oxidação lipídica é determinada pela adição de TBA (ácido tiobarbitúrico), que reage com os produtos da oxidação lipídica, principalmente o malondialdeído (MDA), formando um composto que pode ser medido espectrofotometricamente. O MDA é derivado da ruptura da endociclicação de ácidos graxos poliinsaturados com mais de duas duplas ligações tais com o ácido linoléico, araquidônico e decosahexanóico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A oxidação é inibida pela adição de um antioxidante e então a redução da absorbância é vista (ANTOLOVICH et al., 2001). Em comparação com os métodos do DPPH e FRAP, o método de TBARS está mais próximo das condições biológicas, pois utiliza um substrato oxidável existente biologicamente (ácidos graxos). É um método simples e sensível (KAPPUS, 1985), porém, o teste não é específico para o MDA, pois outras substâncias também reagem com este composto, como, por exemplo, alcanos, alcenos, alcadienos e aldeídos. Metais de transição e açúcares (glicose e sacarose) também interferem na reação (ESTERBAUER et al., 1984).

O ensaio do branqueamento do  $\beta$ -caroteno é baseado no branqueamento competitivo do  $\beta$ -caroteno durante a autooxidação do ácido linoléico em emulsão aquosa monitorada como

o decaimento da absorvância na região do visível (MILLER, 1971). A adição de uma amostra contendo antioxidantes individuais (VON GADOV, JOUBERT e HANSMANN, 1997) ou extratos naturais (MOURE et al., 2000) reduz o decaimento da absorvância do  $\beta$ -caroteno (ROGINSKY e LISSI, 2005). Este método fornece um percentual da inibição do branqueamento do  $\beta$ -caroteno em relação a um controle sem antioxidante. É um método simples, sensível, mas não específico (substâncias oxidantes ou redutoras interferem no ensaio) (FRANKEL, 1994). A cooxidação do  $\beta$ -caroteno é normalmente efetuada num meio emulsionado, o que origina muitas vezes falta de reprodutibilidade dos valores de absorvância medidos. Acresce ainda a dificuldade de interpretação dos resultados devida à interação do  $\beta$ -caroteno com o oxigênio (BERSET e CUVELIER, 1996; VON GADOW, JOUBERT e HANSMANN, 1997). Apesar dos inconvenientes referidos, o método é amplamente usado. Como não recorre a altas temperaturas, permite a determinação do poder antioxidante de compostos termossensíveis e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de extratos vegetais (BERSET e CUVELIER, 1996).

## **4 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

### **4.1 Manuscrito 1**

**Caracterização físico-química de variedades de amora-preta da região sul do Brasil**

**Submetido à revista**

**Ciência Rural**

(configurado conforme as normas da revista)



## Caracterização físico-química de variedades de amora-preta da região sul do Brasil

### Physicochemical characterization of blackberry from the Southern Region of Brazil

Gabriela Elisa Hirsch<sup>I</sup>; Elizete Maria Pesamosca Facco<sup>II</sup>; Daniele Bobrowski Rodrigues<sup>III</sup>; Márcia Vizzotto<sup>IV</sup>; Tatiana Emanuelli<sup>III\*</sup>

#### Resumo

A amora-preta (*Rubus sp.*) é uma fruta cuja exploração comercial está iniciando no Brasil. Seu cultivo iniciou na década de 70 e vem aumentando com a introdução e adaptação de novas cultivares. Porém, pouco se conhece sobre as disparidades geradas na composição e nas características das frutas dessas novas plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas de diferentes cultivares (Tupy, Guarani e Cherokee) e seleções (02/96, 07/001 e 03/001) de amora, que estão sendo estudadas para originar cultivares adaptadas a região Sul do Brasil. Foram analisados a cor objetiva (CIELab), sólidos solúveis totais (SST), pH, acidez total titulável composição centesimal e ácidos graxos de amoras. As frutas apresentaram umidade entre 84,8 e 90,3%; proteína entre 0,09 e 0,14%, fibra alimentar entre 5,8 e 5,5%, gordura entre 0,15 e 0,30% e cinzas entre 0,27 e 0,49%. A seleção 02/96 apresentou menor teor de cinzas. Os SST variaram entre 7,3 a 10,2 °Brix, a acidez variou entre 1,30 e 1,58% em ácido cítrico e o pH entre 2,8 e 3,1. A seleção 03/001 apresentou menor valor de SST que as demais e menor tendência ao vermelho, mas maior intensidade de cor que a cultivar Tupy. Os ácidos graxos encontrados em maior concentração foram o ácido palmítico (22-29%), oléico (13-32%) e linoléico (15-33%), com diferenças nas concentrações entre os tipos de amora. As variedades de amora-preta avaliadas apresentaram bom valor

---

<sup>I</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>II</sup> Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil.

<sup>III</sup> Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL), Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, n.1000, Bairro Camobi - 97105-900 – Santa Maria, RS - Brasil. E-mail: tatiemanuelli@smail.ufsm.br. \* Autor para correspondência.

<sup>IV</sup> Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil.

nutricional com níveis de açúcar e acidez adequados para a industrialização, e contém ácidos graxos importantes para a manutenção da saúde.

**Palavras-chave:** *Rubus sp.*, SST, cor, acidez total titulável, composição centesimal, ácidos graxos.

### **Abstract**

A blackberry (*Rubus sp.*) is a fruit whose commercial exploitation is starting in Brazil. Its cultivation began in the 70's and is increasing with the introduction and adaptation of new cultivars. However, little is known about the disparities in the composition and characteristics of the fruit from these new plants. The objective of this study was to evaluate the physicochemical characteristics of different cultivars (Tupy, Guarani and Cherokee) and selections (02/96, 07/001 and 03/001) of blackberries, which are being studied to generate cultivars adapted to Southern Region of Brazil. The objective color (CIELab), total soluble solids (TSS), pH, total titrable acidity, proximate composition and fatty acids of blackberries were evaluated. The fruit humidity ranged between 84.8 and 90.3%; protein between 0.09 and 0.14%, dietary fiber between 5.5 and 5.8%, fat between 0.15 and 0.30% and ash between 0.27 and 0.49%. Selection 02/96 had the lowest ash content. TSS ranged from 7.3 to 10.2 ° Brix, acidity ranged between 1.30 and 1.58% citric acid and pH between 2.8 and 3.1. Selection 03/001 had the lowest TSS value and it also had lower redness, but higher color saturation than Tupy cultivar. Selection 03/001 showed more intense color and bright. The fatty acids found in higher concentration were palmitic (22-29%), oleic (13-32%) and linoleic acid (15-33%), with differences in the concentration among blackberry genotypes. The varieties of blackberry evaluated showed good nutritional value with sugar and acidity levels suitable for industrialization. It also contained fatty acids important for maintaining health.

**Key words:** *Rubus sp.*, total soluble solids, color, total titrable acidity, proximate composition, fatty acids.

## INTRODUÇÃO

Pequenas frutas vêm despertando a atenção de pesquisadores, produtores e consumidores por apresentarem, além de nutrientes básicos, fibras, micronutrientes essenciais como minerais e vitaminas, e diversos compostos secundários de natureza fenólica (HARBONE & WILLIAMS, 2000).

A amoreira-preta (*Rubus sp.*) é uma espécie arbustiva de porte ereto ou rasteiro, nativa da Ásia, Europa e América, bem adaptada a regiões com inverno bem definido (MOORE, 1984). Ela produz frutos agregados com cerca de quatro a sete gramas, de coloração negra e sabor ácido a doce-ácido). É uma planta rústica que apresenta baixo custo de produção, facilidade de manejo e requer pouca utilização de defensivos agrícolas, sendo, por isso, uma alternativa interessante para o cultivo na agricultura familiar (ANTUNES, 2002).

No Brasil, a cultura da amora-preta foi introduzida pela Estação Experimental de Pelotas, atual Embrapa Clima Temperado, no Rio Grande do Sul, na década de 70, e desde então seu cultivo vem crescendo nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, com a introdução e adaptação de novas cultivares (ANTUNES, 2002). As amoras estão disponíveis na forma fresca (*in natura*) e também congeladas e processadas termicamente na forma de geléias, sucos, polpa, entre outros produtos (ANTUNES, 2002; MOTA, 2006).

Existem inúmeras cultivares de amoreira-preta, mas as selecionadas no Brasil são Tupy, Guarani, Negrita, Caingangue e Ébano (ANTUNES, 2002). As cultivares Tupy e Guarani são recomendadas para o consumo *in natura* pelo fato de apresentarem baixa acidez, sendo que a Guarani também é recomendada para industrialização (SANTOS & RASEIRA, 1988). Já a Cherokee, selecionada nos EUA, exige clima frio para se desenvolver (RASEIRA et al., 1984).

A amoreira-preta apresenta frutas de alta qualidade nutricional e valor econômico significativo (ANTUNES, 2002a). Elas são ricas em vitamina C e contém em torno de 85% de água, 10% de carboidratos, elevado conteúdo de minerais, vitaminas do complexo B e A, além de ser fonte de compostos funcionais, como ácido elágico e antocianinas. Também é rica em fibras e ácido fólico (ANTUNES et al., 2002b; MORENO-ALVAREZ et al., 2002). A fruta da amoreira contém ainda ácidos graxos essenciais, como o linoléico e o linolênico. Esses compostos devem ser obtidos através da dieta e são importantes para regular várias funções do corpo, incluindo pressão arterial, viscosidade sanguínea, imunidade e resposta inflamatória (PAWLOSKEY et al., 1996).

Além disso, o cultivo da amora vem sendo incentivado em função do potencial para a comercialização e industrialização. No entanto, pouco se conhece sobre o valor nutricional, e parâmetros de qualidade das diferentes variedades de amora que estão desenvolvidas/introduzidas no Brasil. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi comparar as características físico-químicas de cultivares de amora-preta já difundidas no Brasil, com seleções que estão sendo desenvolvidas na Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados frutos de amoreira (*Rubus sp.*) das cultivares Guarani, Cherokee e Tupy e das seleções 02/96, 03/001 e 07/001 produzidos na Embrapa Clima Temperado, em Pelotas (RS; 31°40'47''S, 52°26'24''O, 60 m). Foram coletados dois lotes independentes de cada cultivar e três lotes independentes de cada seleção (aproximadamente 400g cada) de frutas no ano de 2007. Cada lote era uma mistura de frutos completamente maduros colhidos de diversas plantas. As amostras foram trituradas integralmente em multiprocessador e após, armazenadas a -20°C até o momento das análises.

A gordura foi quantificada gravimetricamente após extração com clorofórmio e metanol (BLIGH & DYER, 1959). Os demais parâmetros da composição centesimal foram avaliados

através dos métodos preconizados pela AOAC (1995), incluindo a análise de umidade em estufa a vácuo e fibra alimentar total por método enzimático-gravimétrico. Os sólidos solúveis totais foram analisados utilizando-se refratômetro de Brix (AOAC, 1995). Foram realizadas as análises de pH (AOAC, 1995) e acidez total titulável (AOAC, 1995), parâmetros regulamentados na legislação brasileira (BRASIL, 1999) como norma para produção da polpa, além da análise de cor. A cor foi avaliada objetivamente pela reflectância no espaço de cor CIELab usando colorímetro Minolta CR-300, com iluminante padrão D65 e ângulo de observação de 2°. Os parâmetros de cor indicam a luminosidade ( $L^*$ ) e a cromaticidade da amostra ( $+a^*$  direção para o vermelho,  $-a^*$  direção para o verde,  $+b^*$  direção para o amarelo e  $-b^*$  direção para o azul). O croma ( $C^*$ ) expressa a saturação ou intensidade da cor, enquanto o ângulo de matiz (H) indica a cor observável e é definido como iniciando no eixo  $+a^*$ , em graus, onde  $0^\circ$  é  $+a^*$  (vermelho),  $90^\circ$  é  $+b^*$  (amarelo),  $180^\circ$  é  $-a^*$  (verde), e  $270^\circ$  é  $-b^*$  (azul). Para a análise de cor, foram colocados em uma placa de Petri 40mL de amostra triturada, sendo realizadas 3 leituras seqüenciais de cada amostra, com homogeneização manual da amostra entre as leituras.

A gordura extraída segundo BLIGH & DYER (1959) foi submetida a metilação dos ácidos graxos segundo HARTMAN & LAGO (1973). A composição de ácidos graxos foi determinada em cromatógrafo gasoso Agilent Technologies 6890N, com detector de ionização em chama, injetor split operando em razão de 50:1 e coluna capilar DB-23 (60m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m, Agilent). Os parâmetros de operação foram: temperatura do injetor 250°C; temperatura da coluna 140°C por 5 min e programada ao aumento de 4°C/min até atingir 240°C, permanecendo estável por mais 5 min, e temperatura do detector 280°C. Para a identificação dos ácidos graxos foi realizada a comparação dos tempos de retenção dos picos dos cromatogramas das amostras com padrões de ésteres metílicos (Supelco 37-component FAME Mix).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis grupos e 2 a 3 repetições por grupo. Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância de uma via, seguida do teste de Tukey a um nível de confiança de 95%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os valores de pH das amoras-pretas ficaram na faixa entre 2,78 e 3,08, não havendo diferença significativa entre os distintos genótipos (Tabela 1). Independente do genótipo, a amora-preta apresentou valores de pH baixos, conforme esperado, devido as suas características naturais de sabor ácido a doce-ácido. Esta é uma característica desejável para a industrialização da fruta. Segundo a CETEC (1985), o pH ótimo para a formação do gel, na fabricação de geléias, é de 3,0 a 3,2. Assim, as amoras avaliadas são propícias para a industrialização, pois dispensam o uso de acidulantes na fabricação de geléias, o que reduzirá os custos. NAUMANN & WITTENBURG (1980) observaram considerável diminuição de ácido cítrico em frutas de quatro cultivares de amoreira-preta, que foi atribuída à elevação da temperatura em pré-colheita. A manutenção da acidez do fruto é importante porque garante sabor e odor ao produto (CHITARRA & CHITARRA, 1990). Os valores de pH encontrados no presente estudo são um pouco inferiores aos relatados para os cultivares Guarani, Tupy e Cherokee, obtidos do banco de germoplasma da Estação Experimental da EPAMIG em Caldas, Minas Gerais, que foram 3,38, 3,26 e 3,39, respectivamente (MOTA, 2006).

O teor de SST das amostras, que é um indicativo do teor de açúcares, variou entre 7,3 e 10,2 °Brix, sendo que a seleção 03/001 apresentou valor significativamente inferior ao das cultivares Tupy e Guarani e ao da seleção 07/001 (Tabela 1). Isso pode ser explicado pelas diferentes características de cada cultivar. HASSIMOTO et al. (2008) encontraram valores de SST levemente menores do que os deste estudo para as cultivares Tupy e Guarani (6,9 e 9,2 °Brix), que pode estar relacionado a diferenças nas características climáticas da região de cultivo (Caldas, MG).

A acidez e o teor de açúcar são dois importantes parâmetros utilizados como referência para classificar as polpas para a produção de sucos. As amoras avaliadas neste estudo se mostraram boas matérias-primas para a fabricação de sucos e polpas, com acidez entre 1,30% a 1,58% de ácido cítrico, sem diferença significativa entre as amostras (Tabela 1).

A amora-preta apresenta alto conteúdo de água, o que foi confirmado pelos resultados encontrados para as diferentes variedades de amora, que apresentaram valores entre 84,8% e 90,3%, sem diferença significativa entre as amostras (Tabela 1). Em consequência disso, para as demais determinações encontraram-se valores menores. Os valores de proteína e fibra alimentar, neste estudo, foram de 0,09 a 0,14% e 5,5 a 5,8%, sem diferenças significativas entre as amostras. Diferente do observado para proteínas, fibra e umidade, o conteúdo de cinzas apresentou variação significativa entre as amostras, indicando diferenças no conteúdo de minerais. A seleção 02/96 apresentou menor conteúdo de cinzas que todas as demais amostras, com exceção da seleção 03/001, enquanto a seleção 03/001 apresentou menor conteúdo de cinzas que a cultivar Guarani. A gordura total apresentou-se com valores baixos, variando entre 0,15% a 0,30%, sem diferença significativa entre as amostras.

A cor é um importante parâmetro para produtores e consumidores, pois indica se o fruto apresenta ou não as condições ideais para comercialização e consumo. Porém, a cor, na maioria dos casos, não contribui para um aumento efetivo no valor nutritivo ou qualidade do produto (CHITARRA & CHITARRA, 1990). Mas, em geral, consumidores têm preferência por frutos de cor forte e brilhante. Em relação ao ponto de colheita, este é determinado quando o fruto estiver totalmente preto, devendo a colheita ser realizada a cada dois a três dias (BASSOLS, 1980; RASEIRA et al., 1984). Na avaliação de cor, utilizando-se colorímetro Minolta, segundo TOSUN et al. (2008), a luminosidade ( $L^*$ ) diminui com o amadurecimento dos frutos de amora-preta, indicando que a cor fica mais intensa ou escura. O aparecimento da cor púrpura pode estar relacionado, também, com a grande quantidade de compostos fenólicos

presentes na amora-preta. Valores de H mais próximos de 0 indicam frutos com maior tendência ao vermelho, enquanto valores de H mais próximos de 90 indicam frutos com maior tendência ao amarelo. Os valores de croma indicam a intensidade da cor, ou seja, valores maiores indicam amostras com cores mais intensas. Em todos os parâmetros de cor avaliados, com exceção de L\*, a seleção 03/001 apresentou valores significativamente superiores aos da cultivar Tupy, não tendo sido observadas outras diferenças entre as amostras (Tabela 2). Então, as amostras da seleção 03/001 apresentaram menor tendência ao vermelho (maior valor H), mas maior intensidade de cor (maior C) que as de Tupy, o que possivelmente aumentaria a sua aceitação pelos consumidores.

Segundo AITZETMÜLLER (1993), os ácidos graxos predominantes nas plantas são o ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1n9), linoléico (18:2n6) e o ácido alfa-linolênico (18:3n3). Na análise dos ácidos graxos das diferentes seleções e cultivares de amora-preta (*Rubus sp.*) deste estudo, foram encontrados seis ácidos graxos (ácido mirístico, palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico). O ácido linoléico foi o ácido graxo predominante encontrado em diferentes genótipos de amora-preta da Turquia (SEZAI & ORHAN, 2008). Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, onde este foi o ácido graxo predominante nas amostras, juntamente com o ácido oléico e o palmítico (Tabela 3). As análises das diferentes seleções e cultivares de amora-preta mostraram que a predominância de ácidos graxos variou conforme a amostra. As seleções 07/001 e 02/96 apresentaram maior concentração de ácido linoléico do que as cultivares Guarani e Cherokee, enquanto que a seleção 03/001 e cultivar Tupy mostraram quantidades intermediárias deste ácido graxo. Conseqüentemente, o ácido oléico apresentou menor concentração nas seleções em relação às cultivares Guarani e Cherokee. Este último ácido graxo é considerado favorável para a saúde, sendo que dietas que apresentam quantidades elevadas de ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oléico, são capazes de reduzir a concentração de colesterol



plasmático, de LDL e de triglicerídeos (KRIS-ETHERTON et al, 1999), e a substituição de ácidos graxos saturados por ácidos graxos insaturados com configuração *cis* reduz o risco de doenças cardiovasculares (MENSINK et al. 2003). Essas diferenças nas concentrações dos ácidos oléico e linoléico na amora-preta podem estar relacionadas ao genótipo das variedades. Para os demais ácidos graxos não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras.

## CONCLUSÃO

As cultivares e seleções de amora-preta (*Rubus sp.*) avaliadas apresentaram bom valor nutricional, destacando-se pelo conteúdo de açúcares e fibra alimentar, podendo ser usada como fonte destes nutrientes, na forma *in natura*. As amoras-pretas avaliadas apresentaram bastante semelhança entre si em relação ao conteúdo de nutrientes, com exceção do teor de minerais, que foi inferior nas seleções 02/96 e 03/001. A análise dos ácidos graxos mostrou que a amora-preta é um alimento onde se encontram ácidos graxos importantes para a saúde, principalmente nas cultivares Guarani e Cherokee que apresentaram maior concentração de ácido oléico. Porém, como a amora apresenta baixa concentração de gordura, não poderia ser considerada uma fonte desses ácidos graxos para a dieta humana.

A seleção 03/001 apresentou menor tendência ao vermelho e maior intensidade de cor, o que poderia aumentar a aceitação da fruta pelo consumidor, já que este é um importante parâmetro avaliado pelos mesmos. Além disso, as amoras avaliadas apresentaram alta acidez, sendo propícias para a fabricação de geléias.

## AGRADECIMENTO

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida a G.E. Hirsch. Estudo financiado pela Embrapa Clima Temperado e Edital Casadinhos (FAPERGS/CAPES).

## REFERÊNCIAS

AITZETMÜLLER, K. Capillary GLC fatty acid fingerprints of seed lipids - a tool in plant Chemotaxonomy. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 16, p. 488-490, 1993.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the association of the official analytical chemists**. Arlington: AOAC, 1995. 16.ed. 1750p.

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

ANTUNES, L.E.C.; REGINA, M.A.; DUARTE FILHO, J. **A cultura da amora-preta**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 28p. (EPAMIG. Boletim Técnico, 69).

BASSOLS, M.C. **A cultura da amora preta**. Pelotas : EMBRAPA/UEPAE de Cascata, 1980. 11p. (Circular Técnica, 4).

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.

Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 136, de 31 de março de 1999, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1º de abr. 1999, Seção 1, p.25

CETEC. **Manual para fabricação de geléias**. Belo Horizonte: CETEC, 1985. Caps. 3 e 4, p. 17-30.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320p.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

HARTMAN, L; LAGO, R.C.A. A rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, p.475-477, 1973.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p. 1009-1015, 1999.

HASSIMOTTO, N. M. A. et al. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus sp.*) grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 28, p. 702-708, 2008.

MENSINK, R. P. et al. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77; p. 1146-1155, 2003.

MORENO-ALVAREZ, A. J. et al. Estabilidad de antocianinas em jugos pasteurizados de mora (*Rubus glaucus* Benth). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 52, p. 181-186, 2002.

MOTA, R. V. Physico and chemical characterisation of blackberry jam. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 539 – 543, 2006.

NAUMANN, W. D.; WITTENBURG, U. Antocyanins, soluble solids, and titratable acidity in blackberries as influenced by preharvest temperatures. **Acta Horticulturae**, n. 112, p. 183-190, 1980.

PAWLOSKEY, R. J. et al. Essential fatty acid uptake and metabolism in the developing rodent brain. **Lipids**, v. 31(suppl), S103–S107, 1996.

RASEIRA, M.C.B.; SANTOS, A.M.; MADAIL, J.C.M. Amora preta: cultivo e utilização. **Pelotas : EMBRAPA. CNPFT**, p. 20 (Circular Técnica, 11), 1984.

SANTOS, A. M.; RASEIRA, M.C.B. Lançamento de cultivares de amoreira-preta. **Pelotas : EMBRAPA - CNPFT**, n.p. (EMBRAPA: Informativo 23), 1988.

SEZAI, E.; ORHAN, E. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra L.*) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. **Scientia Horticulturae**, v. 116, p. 41–46, 2008.

TOSUN, I. et al. Mudanças físicas e químicas durante a maturação de frutos de amora-preta. **Scientia Agrícola**, v. 65, p. 87-90, 2008.

Tabela 1. Composição, acidez, pH e sólidos solúveis totais das amostras de amora-preta (*Rubus sp.*)

Amostra de amora	Tupy	Guarani	Cherokee	Sel 02/96	Sel 07/001	Sel 03/001
<b>Proteína (%)</b>	0,09 <sup>ns</sup> ± 0,07	0,13 ± 0,02	0,10 ± 0,06	0,09 ± 0,05	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,02
<b>Umidade (%)</b>	89,0 <sup>ns</sup> ± 0,4	86,1 ± 0,4	90,3 ± 1,8	84,8 ± 2,0	87,6 ± 0,8	89,2 ± 0,4
<b>Cinzas (%)</b>	0,41 <sup>ab</sup> ± 0,02	0,49 <sup>a</sup> ± 0,02	0,46 <sup>ab</sup> ± 0,02	0,27 <sup>c</sup> ± 0,00	0,44 <sup>ab</sup> ± 0,03	0,38 <sup>bc</sup> ± 0,03
<b>Fibra (%)</b>	5,7 <sup>ns</sup> ± 0,0	5,7 ± 0,0	5,5 ± 0,1	5,5 ± 0,0	5,8 ± 0,1	5,6 ± 0,1
<b>Gordura (%)</b>	0,15 <sup>ns</sup> ± 0,13	0,22 ± 0,00	0,24 ± 0,01	0,30 ± 0,11	0,21 ± 0,01	0,16 ± 0,04
<b>Acidez</b> (% ácido cítrico)	1,56 <sup>ns</sup> ± 0,07	1,58 ± 0,04	1,54 ± 0,09	1,34 ± 0,00	1,34 ± 0,00	1,30 ± 0,03
<b>pH</b>	3,06 <sup>ns</sup> ± 0,16	2,83 ± 0,11	2,78 ± 0,16	3,08 ± 0,09	3,00 ± 0,24	2,80 ± 0,17
<b>SST (°Brix)</b>	10,1 <sup>a</sup> ± 0,3	10,2 <sup>a</sup> ± 0,4	8,4 <sup>ab</sup> ± 0,2	9,6 <sup>ab</sup> ± 1,2	9,9 <sup>a</sup> ± 1,0	7,3 <sup>b</sup> ± 0,5

Os resultados são a média±desvio padrão de 2 a 3 lotes independentes. Os valores que não possuem pelo menos uma letra em comum na mesma linha são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ns= não significativo.

Tabela 2. Parâmetros de cor das amostras de amora-preta (*Rubus sp.*)

Amostras de amora	L*	a*	b*	Croma	Ângulo de matiz (H)
Tupy	27,5 <sup>ns</sup> ± 1,1	18,7 <sup>b</sup> ± 3,1	4,5 <sup>b</sup> ± 1,4	19,2 <sup>b</sup> ± 3,3	13,2 <sup>b</sup> ± 2,0
Guarani	29,7 ± 2,3	22,6 <sup>ab</sup> ± 0,5	5,9 <sup>ab</sup> ± 0,8	22,7 <sup>ab</sup> ± 1,6	14,9 <sup>ab</sup> ± 1,0
Cherokee	29,1 ± 1,6	20,4 <sup>ab</sup> ± 0,6	5,2 <sup>ab</sup> ± 1,6	21,0 <sup>ab</sup> ± 0,7	14,3 <sup>ab</sup> ± 0,0
Sel 02/96	28,9 ± 2,0	22,4 <sup>ab</sup> ± 2,6	6,5 <sup>ab</sup> ± 1,2	23,0 <sup>ab</sup> ± 3,3	16,0 <sup>ab</sup> ± 1,1
Sel 07/001	28,7 ± 2,4	23,6 <sup>ab</sup> ± 4,8	7,3 <sup>ab</sup> ± 2,6	24,7 <sup>ab</sup> ± 5,3	16,8 <sup>ab</sup> ± 2,4
Sel 03/001	31,4 ± 1,8	30,8 <sup>a</sup> ± 3,0	11,2 <sup>a</sup> ± 1,9	32,8 <sup>a</sup> ± 3,5	19,8 <sup>a</sup> ± 1,5

Os resultados são a média ± desvio padrão de 2 a 3 lotes independentes. Os valores que não possuem pelo menos uma letra em comum na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). L\*: luminosidade; a\*: tendência ao vermelho; b\*: tendência ao amarelo, croma: intensidade da cor e H: ângulo de matiz ou cor observável. ns= não significativo.

Tabela 3. Composição dos ácidos graxos (% do total de ácidos graxos) de amostras de amora-preta (*Rubus sp.*)

Amostras de amora	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3	NI
Tupy	2,7 ± 0,8 <sup>ns</sup>	28,9 ± 1,0 <sup>ns</sup>	5,8 <sup>ns</sup> ± 2,8	20,7 <sup>b</sup> ± 3,3	24,8 <sup>ab</sup> ± 2,6	15,9 <sup>ns</sup> ± 3,1	1,2 <sup>ns</sup> ± 1,8
Guarani	2,5 ± 0,1	22,0 ± 3,0	6,0 ± 0,5	31,8 <sup>a</sup> ± 2,9	15,3 <sup>c</sup> ± 0,3	18,2 ± 1,2	4,0 ± 1,7
Cherokee	3,0 ± 0,4	24,5 ± 1,8	5,8 ± 0,4	29,4 <sup>a</sup> ± 0,5	19,1 <sup>b,c</sup> ± 4,6	15,0 ± 2,1	3,2 ± 4,5
Sel 02/96	3,3 ± 0,4	27,8 ± 0,4	5,9 ± 0,3	15,9 <sup>b,c</sup> ± 1,4	32,4 <sup>a</sup> ± 0,1	14,7 ± 1,6	0,0 ± 0,0
Sel 07/001	2,6 ± 0,8	26,1 ± 0,2	6,1 ± 0,1	13,1 <sup>c</sup> ± 0,0	32,8 <sup>a</sup> ± 0,1	19,3 ± 1,1	0,0 ± 0,0
Sel 03/001	1,0 ± 1,5	25,6 ± 3,4	6,0 ± 0,9	18,4 <sup>b,c</sup> ± 0,3	26,6 <sup>ab</sup> ± 3,0	18,0 ± 0,1	4,4 ± 6,2

Os resultados são a média ± desvio padrão de 2 a 3 lotes independentes. Os valores que não possuem pelo menos uma letra em comum na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). C14:0= ácido mirístico; C16:0= ácido palmítico; C18:0= ácido esteárico; C18:1n9c= ácido oléico; C18:2n6c= ácido linoléico; C18:3n3= ácido linolênico; NI= compostos não identificados; ns= não significativo.

## 4.2 Manuscrito 2

**Antioxidant activity of blackberry (*Rubus sp.*) genotypes from the Southern Region of  
Brazil.**

**Submetido à revista**

**Scientia Horticulturae**

(configurado conforme as normas da revista)



**Antioxidant activity of blackberry (*Rubus sp.*) genotypes from the Southern Region of Brazil.**

Gabriela Elisa Hirsch<sup>a</sup>, Márcia Vizzotto<sup>b</sup>, Ana Lucia Aboy<sup>c</sup>, Amélia Teresinha Henriques<sup>c</sup>,  
Tatiana Emanuelli<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL), Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Corresponding author:**

Tatiana Emanuelli

Núcleo Integrado de Desenvolvimento de Análises Laboratoriais (NIDAL)

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos

Centro de Ciências Rurais

Universidade Federal de Santa Maria

Campus - Camobi, 97105-900

Santa Maria, RS - Brasil

Telephone: +55 55 3220 8547

Fax: +55 55 3220 8353

E-mail: [tatiemanuelli@gmail.com](mailto:tatiemanuelli@gmail.com)

## **Abstract**

The antioxidant activity and bioactive compounds of extracts from different blackberry fruit genotypes from the major Brazilian producer region (three cultivars and four selections) were evaluated and compared to the Cherokee cultivar. Four different antioxidant assays were conducted to assess the antioxidant activity of both phenolic and anthocyanic fruit extracts. Regarding the phenolic extracts, selections 02/96 and 07/001 had higher antioxidant activity than the cultivars in most assays, and this activity was partially correlated to the higher amount of total phenolics in these samples. Thus, the phenolic compounds are probably the major responsible for the antioxidant activity in the diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging assay (DPPH), ferric-reducing antioxidant power assay (FRAP) and thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS). Quercetin seems to be responsible for the antioxidant activity of blackberry phenolic extracts in the  $\beta$ -carotene bleaching assay. Concerning the anthocyanic extracts, selection 02/96 and Tupy and Cherokee cultivars from harvest 2007 had higher antioxidant activity than the other genotypes in most assays. Anthocyanins appear to be the major responsible for the antioxidant activity of anthocyanic extracts in the DPPH and FRAP assays, although ascorbic acid also contributed to the DPPH antioxidant activity. It was not possible to identify the compound responsible for the TBARS antioxidant activity of anthocyanic extracts. Our results revealed that the new blackberry selections developed by Embrapa, especially selection 02/96 appears to have higher antioxidant activity than the commercial cultivars cultivated in the southern Brazil. Thus, this selection appears to be promising for nutritional and health purposes.

*Keywords:* anthocyanic extract, phenolic extract, antioxidant activity, phenolic compounds, anthocyanins, ascorbic acid.

## 1. Introduction

Blackberry belongs to the Rosaceae family and is classified in the *Rubus* genus (Jennings et al., 1990). Despite being native from Asia, Europe, North and South America, it grows only in specific regions, because most blackberry species are not adapted to regions with mild winter (Moore, 1984). In Brazil, blackberry crop was introduced in the 70s by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) Temperate Climate (Antunes, 2002). Thereafter, Embrapa has conducted a genetic improvement program that developed various blackberry cultivars adapted to the Southern Region of Brazil, including Guarani, Caingangue, Xavante and Tupy. This last one ranks among the most influential fresh market blackberry varieties, because it is cultivated in Brazil and in Mexico, where it is largely exported to the USA. Due to its adequate climate characteristics (temperate climate) Rio Grande do Sul was the first State in Brazil to produce blackberries and it is still the major one (Antunes, 2002).

Blackberry fruits are good sources of natural antioxidants and possess potent antioxidant activity (Koca and Karadeniz, 2009). Their extracts are rich in secondary metabolites such as anthocyanins and phenolic acids (Wang and Lin, 2000), but little is known about the presence and antioxidant activity of these compounds in genotypes adapted and grown in the Rio Grande do Sul state (Brazil).

Phenolic compounds or polyphenols constitute a large and heterogeneous group of substances that have antioxidant activity (Bravo, 1998). Polyphenols and particularly flavonoids have the ideal structure for scavenging free radicals and are considered more effective antioxidants than vitamins C and E. Flavonoids are the largest group of polyphenols found in foods (Scalbert and Williamson, 2000). Anthocyanins are flavonoid compounds that confer various shades between orange, red and blue, exhibited by fruits, vegetables, flowers, leaves and roots. These pigments are particularly abundant in red fruits, such as blackberries

(Wu et al., 2006). Anthocyanins are widely studied because of their antioxidant effects and potential benefits for human health, as shown in a number of *in vitro* and *in vivo* studies (Mazza and Miniati, 1993; Kähkönen and Heinonen, 2003). In addition to phenolic compounds, vitamin C, which includes all compounds exhibiting the biological activity of ascorbic acid, is one of the most important antioxidants supplied by fruits and vegetables (Odrizola-Serrano et al., 2007).

Recent studies suggest that the regular consumption of blackberries may contribute to an important intake of antioxidant polyphenols (Hassimotto et al., 2008). However, the antioxidant activity of fruits and vegetables varies considerably. Differences in the antioxidant activity among cultivars may be explained by genotype (Howard et al., 2003), growing temperature (Wang and Zheng, 2001), growing season, maturity at harvest, environmental stress, and other factors (Reverberi et al., 2001; Kirakosyan et al., 2004). Although many studies evaluated the phenolic content or the antioxidant activity of blackberries (Dugo et al., 2001; Siriwoharn et al., 2004; Seeram et al., 2006; Elisia et al., 2007; Ochmian et al., 2009; Cuevas-Rodríguez et al., 2010), a lower number of studies correlated the antioxidant activity of blackberries (*Rubus sp.*) with their content of bioactive compounds (Cho et al., 2005; Wang et al., 2008; Koca and Karadeniz, 2009; Sariburun et al., 2010). The only study with this approach on Brazilian blackberry genotypes evaluated fruits grown in a tropical climate region, which is not the major producer region (Hassimotto et al., 2008). In addition, to our knowledge there is no study on the antioxidant activity or bioactive compounds in blackberries (*Rubus sp.*) grown in the major Brazilian producer region, which has a temperate climate (Rio Grande do Sul state).

The knowledge on the antioxidant activity and content of bioactive compounds in different fruit genotypes may be useful for genetic improvement programs to select those varieties with higher nutritional value. Thus, the objective of this study was to evaluate the

antioxidant activity and bioactive compounds of extracts from blackberry fruit genotypes produced in the state of Rio Grande do Sul. The fruits were from cultivars and selections developed at Embrapa Temperate Climate (RS, Brazil) and are being studied to yield cultivars adapted to the Southern region of Brazil. For comparison purposes we also evaluated the Cherokee cultivar.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Reagents**

6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ), Folin–Ciocalteu reagent, gallic acid, beta-carotene, linoleic acid, ellagic acid and ascorbic acid were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Quercetin was from Jassem Chemical (Beerse, Belgium). Vanillic acid was from Fluka Chemical (Buchs, Switzerland).

### **2.2. Fruit samples**

Samples of blackberry (*Rubus sp.*) cultivars Guarani, Cherokee and Tupy and Embrapa selections 03/001, 07/001 and 02/96 from the harvest 2007 and samples of cultivars Xavante and Cherokee and Embrapa selection 99 from harvest 2009 were collected at Embrapa Temperate Climate (Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil; 31°40'47''S, 52°26'24''W, 60 m). Only the Cherokee genotype is not originary from Brazil, but it is widely adapted to the Rio Grande do Sul state. Each sample lot was a mixture of completely ripe fruits from various plants of the same genotype. Three independent lots were collected, frozen at -18 °C and transported to the Federal University of Santa Maria. The fruits were fully homogenized in a home multiprocessor and stored at -18 °C until analysis.

### 2.3. Determination of phenolic content

The extraction of phenolic compounds followed the method of Escarpa and González (2001) with some modifications as described by Pellegrini et al. (2007). The homogenized sample (4 g) was extracted in an ultrasonic bath at room temperature in the absence of light with an aqueous solution consisting of 800 mL methanol and 50 mL formic acid per liter. The samples were sequentially extracted with 6 mL of solvent for 1h, 6 mL for 30 min and 3 mL for 30 min. After each extraction, the extracts were filtered under vacuum. The combined filtrate was brought to a final volume of 25 mL with the solvent and stored at -18 °C until required for analysis.

Total phenolic content of extracts was determined using the method of Singleton and Rossi (1965) using Folin-Ciocalteu reagent at 740 nm. Gallic acid was used as a standard for the calibration curve. The amount of total phenolic compounds was calculated and expressed as g of gallic acid equivalent per 100 g fruit.

To determine the composition of phenolics the phenolic extracts were centrifuged at 2,500  $\times$  g and the supernatants were analyzed by HPLC using a Luna C18(2) 100 Å (250 x 4.60 mm, particle size 3  $\mu$ m) column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) equipped with a C18 Bondapak 125 Å (particle size 37-55  $\mu$ m) (Waters, Milford, MA, USA) guard column and a Waters HPLC system (2695 model) with a photodiode array detector (Waters 996 Series). The chromatographic conditions were: 0.5 mL/min flow rate, 10  $\mu$ L injection volume and mobile phase comprised of solvent A, 0.5% formic acid (pH 2.4), and solvent B, 100% acetonitrile. The elution profile was 0 min, 10% B; 1-30 min, linear gradient from 10% to 30% B; 30-55 min, linear gradient from 30% to 100% B, 55-66 min, 100% B; followed over 8 minutes to return the initial conditions (10% B). The detection wavelength was 371 nm. The identification of compounds was performed by the combined use of chromatographic

behavior, co-chromatography with authentic standards and DAD spectra with authentic standards. Quantification of quercetin was achieved using a calibration curve with seven concentrations ( $R^2=0.996$ ). The limit of quantification (LOQ) for quercetin was 190.0  $\mu\text{g}/100$  g fruit and the limit of detection (LOD) was 62.7  $\mu\text{g}/100$  g fruit.

#### **2.4. Determination of anthocyanin content**

The extraction of anthocyanins was performed as described by Lees and Francis (1972). The fruits were homogenized in the extracting solvent containing 95% ethanol and 1.5 N HCl 85:15 v/v. The proportion sample/extracting solvent was 0.8 g/mL. The sample was stored for 12 h at 4 °C, filtered under vacuum and the residue was exhaustingly washed with the extracting solvent for complete removal of pigments. The filtrates were collected in a volumetric flask, brought to 50 mL with the extracting solvent, left to stand in the absence of light for 2 h at room temperature and the absorbance was measured at 535 nm. Total anthocyanin content was calculated using the extinction coefficient  $\epsilon^{1\%} = 98.2$  at 535 nm.

#### **2.6. Determination of ascorbic acid**

The ascorbic acid content of sample extracts was assessed as described by Sánchez-Mata et al. (1999) with some modifications. Extracts of total phenolics and anthocyanins were filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore filter (Bedford, Md., USA) and 10  $\mu\text{L}$  sample were analyzed using an Intralab HPLC system (5100 model) coupled to an UV-visible detector (Intralab 5100) and reverse phase Microsorb - MW C18 column (4.6 x 250 mm, particle size 5  $\mu\text{m}$ ) (Varian). The flow rate was 0.9 mL/min (isocratic gradient) and the mobile phase was a solution of sulfuric acid 0.01% in Milli-Q water (final pH 2.8). The total run time was 8 min and the wavelength of detection was set at 245 nm. Quantification of ascorbic acid was achieved using a calibration curve with 7 concentrations of ascorbic acid ( $R^2=0.999$ ). The

limit of quantification (LOQ) for ascorbic acid was 34.7  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  fruit and the limit of detection (LOD) was 7.4  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  fruit.

## **2.7. Evaluation of antioxidant activity**

Four different methods were used to evaluate the antioxidant activity of phenolic and anthocyanic extracts from blackberries. Since the anthocyanic extracts had a purple color, appropriate blank tubes were conducted containing the extracts to check if it would mask the spectrophotometric measurements of antioxidant activity. At the extract concentrations evaluated only the  $\beta$ -carotene bleaching assay was affected. Thus, this assay was not performed for the anthocyanic extracts.

### **2.7.1. DPPH radical scavenging assay**

A DPPH stable solution was used for determination of the total antioxidant activity of extracts according to Brand-Williams et al. (1995). DPPH solution was previously diluted until  $1.10 \pm 0.02$  absorbance at 515 nm was obtained. The extract (0.05 mL) was mixed with 1.9 mL diluted methanolic DPPH solution. The antiradical power of the different extracts was determined by measuring the decrease of DPPH absorbance against a blank. Trolox was used as standard for the calibration curve and the results were expressed as mmol trolox equivalents/100 g fruit.

### **2.7.2. Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assay**

The method of Benzie and Strain (1996) was used for FRAP assays.  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ solution was prepared by mixing 2.5 mL 10 mM TPTZ solution in 40 mM HCl, 2.5 mL 20 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and 25 mL 0.3 M acetate buffer at pH 3.6. The sample (40  $\mu\text{L}$ ) was mixed with 1.2 mL of ferric-TPTZ reagent and incubated at 37  $^\circ\text{C}$  during 15 min. The absorbance of



the colored complex formed with  $\text{Fe}^{2+}$  and TPTZ was taken at 593 nm. Trolox was used as standard for the calibration curve and the results were expressed as mmol trolox equivalents/100 g fruit.

### **2.7.3. Betacarotene bleaching assay**

The antioxidant activity of extracts was evaluated in a model system of substrate co-oxidation:  $\beta$ -carotene/linoleic acid method (Miller, 1971). This method is based on the ability of extracts to decrease the oxidative losses of  $\beta$ -carotene. Aliquots (100  $\mu\text{L}$ ) of the extract were added to 2.9 mL of the  $\beta$ -carotene solution in a cuvette and mixed. The absorbance at 470 nm was measured immediately and after 2 hours of incubation at 50 °C. A control sample with 100  $\mu\text{L}$  extracting solution of total phenolics instead of the sample extract was also analyzed for antioxidant activity. Antioxidant activity was calculated as percent inhibition relative to the control.

### **2.7.4. Inhibition of lipid oxidation assessed by TBARS**

The ability of extracts from blackberry to inhibit lipid oxidation in homogenates of fish flesh was assessed as previously described (Moller et al., 1999; Kang et al., 2006) with some modifications. Fish flesh was ground, mixed with distilled water (1:3 v/v) and homogenized at 8,000 rpm for 30 s in an Ultra Turrax. Fish homogenate was mixed with different concentrations of phenolic (0.5, 5.0, 50.0 or 60.0  $\mu\text{g}$  of total phenolics/mL of fish homogenate) or anthocyanic extracts (0.12, 1.2, 12.0 or 30.0  $\mu\text{g}$  of total anthocyanins/mL of fish homogenate). Blank tubes in which the vehicle of each extract type was added instead of the extract were used as controls. Ferrous sulfate (0.2 mM) was added to all tubes to accelerate the oxidation. Tubes were incubated at 50 °C for 90 min. After incubation, tubes were centrifuged and the supernatant was used to determine lipid oxidation as 2-thiobarbituric

acid reactive substances (TBARS) using the method described by Buege and Aust (1978). The inhibition of lipid oxidation was calculated as percentage relative to control.

#### **2.7.5. Calculation of the inhibitory concentration 50 (IC<sub>50</sub>)**

The IC<sub>50</sub> for  $\beta$ -carotene bleaching and lipid peroxidation (concentration inhibiting 50% of reaction) was determined by non-linear regression analysis using GraphPad Prism Program version 5.0, and compared by evaluating their confidence intervals. The IC<sub>50</sub> values were expressed as  $\mu\text{g}$  of total phenolics or anthocyanins/mL of reaction assay medium.

#### **2.8. Statistical analysis**

All measurements were carried out in triplicate. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test when appropriate ( $p < 0.05$ ). The relationship between antioxidant compounds (phenolics, quercetin, anthocyanins or ascorbic acid) and antioxidant activity was evaluated by Pearson's and partial correlations ( $p < 0.05$ ). Statistical analyses were carried out using Statistica 6.0 (Copyright StatSoft, Inc 1984-2001).

### **3. Results**

The antioxidant activity of blackberry fruits, determined by the FRAP and DPPH assays, were expressed as equivalents of the standard antioxidant trolox, which is a hydrosoluble analog of vitamin E. Phenolic extracts of selections 07/001 and 02/96 showed the highest ferric reducing antioxidant power followed by Xavante cultivar > selection 99 = selection 03/001 = Tupy > Guarani = Cherokee ( $p < 0.05$ ; Table 1). Selections 07/001 and 02/96 also showed the highest DPPH radical scavenging capacity followed by Guarani cultivar, selection 03/001, selection 99, and Cherokee, while Tupy and Xavante cultivars had the lowest scavenging capacity ( $p < 0.05$ ; Table 1). No significant difference was found

between Cherokee cultivars from harvest 2007 and 2009 in the FRAP or DPPH assays (Table 1).

The antioxidant activity of phenolic extracts was also assessed in the  $\beta$ -carotene bleaching assay (Figure 1A). Two-way ANOVA revealed a significant phenolic concentration x blackberry genotype interaction on the inhibition of  $\beta$ -carotene bleaching ( $p < 0.05$ ). The oxidation of  $\beta$ -carotene was inhibited by all genotypes evaluated in a dose-dependent manner. However, the extracts from Guarani and Xavante cultivars had the highest inhibitory potency in this test (lower  $IC_{50}$  values), followed by selection 07/001, selection 03/001, selection 02/96, Tupy and Cherokee 2007 cultivars (intermediate  $IC_{50}$  values) ( $p < 0.05$ ; Table 1). Cherokee 2009 and selection 99 had the lowest inhibitory potency in this test, with  $IC_{50}$  values significantly higher than Xavante and Guarani. There was no statistical difference in the  $\beta$ -carotene bleaching assay between Cherokee fruits from harvest 2007 and 2009 (Table 1).

We also measured the ability of extracts from different genotypes of blackberry to inhibit lipid oxidation in a fish flesh homogenate (Figure 1B), which was assessed as TBARS formation. Two-way ANOVA also revealed a significant phenolic concentration x blackberry genotype interaction on the inhibition of TBARS formation ( $p < 0.05$ ). The formation of TBARS was inhibited by all genotypes evaluated in a dose-dependent manner. Selections 02/96 had the highest antioxidant activity in the TBARS assay (lowest  $IC_{50}$  value) followed by selection 03/001 and 07/001. Tupy and selection 99 had the lowest antioxidant activity in this test ( $p < 0.05$ ), whereas the other genotypes had intermediate activity (Table 1). Thus, except for selection 99, the fruit cultivars showed lower antioxidant activities in the TBARS assay than the fruit selections. There was no statistical difference in the TBARS formation between Cherokee fruits from harvest 2007 and 2009 (Table 1).

As an effort to identify the major compounds responsible for the antioxidant activity of phenolic extracts from blackberry genotypes we evaluated the extract composition and its

correlation with the antioxidant activity. The total phenolic content was significantly different among the genotypes evaluated (Table 2). The selections 07/001 and 02/96 had significantly higher total phenolic content than selection 03/001, selection 99, Guarani, Cherokee and Xavante cultivars, whereas Tupy cultivar had intermediate value ( $p < 0.05$ ). As observed in the antioxidant assays, we found no significant difference in the total phenolic content between Cherokee fruits from harvest 2007 and 2009.

In the HPLC analysis of the genotypes harvested at 2007 it was possible to identify ellagic acid, vanillic acid, and quercetin, but ellagic acid and vanillic acid were found only at trace amounts, for this reason only quercetin was quantified. In addition to these phenolic compounds, other large peaks were found in the chromatogram, but unfortunately they could not be identified (data not shown). Guarani cultivar had the highest concentration of quercetin among the genotypes studied, whereas the Tupy cultivar showed intermediate levels that were significantly higher than the other genotypes (Table 2;  $p < 0.05$ ).

In general, small amounts of ascorbic acid were found in the phenolic extracts from blackberry genotypes (Table 2) and they were lower than the limit of quantification (LOQ = 34.7  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  fruit). However, it was possible to quantify the ascorbic acid content of selection 99 and Xavante cultivar that were higher than the other genotypes ( $p < 0.05$ ; Table 2).

We found a positive correlation between total phenolic content and the antioxidant activity assessed by the FRAP assay ( $r^2 = 0.746$ ;  $p < 0.05$ ) and DPPH assay ( $r^2 = 0.785$ ;  $p < 0.05$ ). However, no significant correlation was found between quercetin content and the antioxidant activity assessed by the DPPH or FRAP assays. Although no significant correlation was found between total phenolic content and the antioxidant activity assessed by the  $\beta$ -carotene bleaching method, there was a strong negative correlation between the content of quercetin and the  $\text{IC}_{50}$  values for  $\beta$ -carotene bleaching ( $r^2 = -0.844$ ;  $p < 0.05$ ). A significant negative correlation was found between total phenolic content and the  $\text{IC}_{50}$  values for the TBARS

assay ( $r^2 = -0.565$ ;  $p < 0.05$ ). However, no significant correlation was found between quercetin and  $IC_{50}$  values for the TBARS assay. The ascorbic acid content of phenolic extracts had no significant correlation with any of the antioxidant assays evaluated ( $p > 0.05$ ).

The antioxidant capacity of the anthocyanic extracts was evaluated only by the FRAP, DPPH and TBARS assays (Table 3) because the intense color of these extracts interfered in the  $\beta$ -carotene bleaching assay. In the FRAP assay, the selections 07/001, 03/001 and 02/96 and the Cherokee cultivar from 2007 harvest had greater ferric reducing power than the other samples ( $p < 0.05$ ). Guarani, Tupy and Xavante cultivars had intermediate FRAP values, while Cherokee 2009 had the lowest antioxidant power ( $p < 0.05$ ). Selection 99 had FRAP values that were similar both to Cherokee and to the cultivars of the intermediate group. In the DPPH assay, all extracts from the 2007 harvest year had greater antioxidant capacity than the extracts from fruits harvested in 2009 ( $p < 0.05$ ).

Concerning the TBARS assay, two-way ANOVA revealed a significant anthocyanin concentration x blackberry genotype interaction on the inhibition of TBARS formation in fish flesh homogenates ( $p < 0.05$ ; Figure 2). The formation of TBARS was inhibited by all genotypes evaluated in a dose-dependent manner. The genotypes of the 2009 harvest year (Cherokee, Xavante and selection 99) had the greater potency to inhibit lipid oxidation in the TBARS assay (lowest  $IC_{50}$  values,  $p < 0.05$ ; Table 3). Cherokee 2007 and Tupy cultivars and selection 02/96, had intermediate antioxidant activity, while Guarani cultivar and selections 07/001 and 03/001 had the lowest antioxidant activity in the TBARS assay (higher  $IC_{50}$  value,  $p < 0.05$ ; Table 3).

To identify some compounds responsible for the antioxidant activity of the anthocyanic extracts we evaluated the anthocyanin and ascorbic acid content of the extracts (Table 4) and its correlation with the antioxidant activity. Selection 07/001 had the highest total anthocyanin content and the genotypes harvested in 2009 (Xavante and Cherokee

cultivars and Selection 99) had the lowest content ( $p < 0.05$ ), whereas the other genotypes had intermediate amounts (Table 4). Unlike the phenolic extracts, the anthocyanic extracts had relevant amounts of ascorbic acid (Table 4). The anthocyanic extracts from Guarani, Tupy and Cherokee 2007 cultivars had the highest levels of ascorbic acid, while all selections (07/001, 03/001, 02/96 and 99) had intermediate values ( $p < 0.05$ ). Xavante and Cherokee cultivars from harvest 2009 had the lowest amounts of ascorbic acid compared to the other samples ( $p < 0.05$ ).

The DPPH values were positively correlated both to the total anthocyanins ( $r^2 = 0.921$ ;  $p < 0.05$ ) and ascorbic acid contents ( $r^2 = 0.674$ ;  $p < 0.05$ ). Since there was a tendency of a significant correlation between total anthocyanins and ascorbic acid content ( $r^2 = 0.459$ ;  $p = 0.055$ ), we performed partial correlations between DPPH values and the content of these compounds. Partial correlation revealed a positive correlation between DPPH and anthocyanins controlling for the content of ascorbic acid ( $r^2 = 0.931$ ;  $p < 0.05$ ) and also a positive correlation between DPPH and ascorbic acid content controlling for the content of anthocyanins ( $r^2 = 0.724$ ;  $p < 0.05$ ). Unlike the DPPH, the FRAP values were only correlated to the content of total anthocyanins ( $r^2 = 0.728$ ;  $p < 0.05$ ), whereas the antioxidant activity assessed by the TBARS assay was not correlated to the compounds analyzed (total anthocyanins and ascorbic acid).

#### **4. Discussion**

Because of multiple reaction characteristics and mechanisms, a single antioxidant assay will not accurately reflect all antioxidants in a mixed or complex system (Antolovich et al., 2002). Thus, the use of different antioxidant assays help to identify variations in the response of the compounds extracted from fruits (Antolovich et al., 2002). For this reason, four different antioxidant assays were conducted to clarify different aspects of the antioxidant

capacity of phenolic extracts from blackberries of the major producer region of Brazil (temperate climate region). The DPPH and FRAP assays are indicated as simple and rapid methods for assessing the antioxidant activity of fruits and vegetables (Antolovich et al., 2000; Bagetti et al., 2009; 2011). In the FRAP assay the antioxidant capacity is measured as the ability to reduce  $Fe^{3+}$ -TPTZ complex to  $Fe^{2+}$ -TPTZ complex (Benzie and Strain, 1996), whereas the DPPH assay involves a fast electron transfer process from phenolic compounds to the DPPH radical (Brand-Williams et al., 1995; Martins et al., 2009). Despite some differences, the FRAP and DPPH antioxidant assays of phenolic extracts showed similar results, with selections 07/001 and 02/96 exhibiting the highest antioxidant capacity.

Although widely used in the screening of antioxidant compounds, the DPPH and FRAP assays are conducted at conditions far from that found in food systems or in the human body (pH, synthetic free radical, among other factors) (Antolovich et al., 2002). In contrast, the  $\beta$ -carotene bleaching and the TBARS assays, are conducted at conditions more similar to that found in food systems and thus give us a clearer idea of the antioxidant properties of the compounds tested (Antolovich et al., 2002).

The  $\beta$ -carotene bleaching assay is based on the competitive bleaching of  $\beta$ -carotene during the autoxidation of linoleic acid in aqueous emulsion monitored as the decay of  $\beta$ -carotene absorbance in the visible region (Miller, 1971). The addition of an antioxidant attenuates  $\beta$ -carotene bleaching (Moure et al., 2000). The phenolic extracts from Guarani and Xavante cultivars had the highest inhibitory potency in this test (lower  $IC_{50}$  values), followed by selection 07/001, selection 03/001, selection 02/96 and Tupy and Cherokee 2007 cultivars. Hassimotto et al. (2008) did not find significant differences in the antioxidant activity among different blackberry genotypes including Tupy and Guarani in the  $\beta$ -carotene assay. However, these authors evaluated only the effect of one fixed amount of the extract, which is not appropriate to estimate and compare the inhibitory potency.

We also measured the ability of phenolic extracts to inhibit iron-induced lipid oxidation in a fish flesh homogenate, which was assessed as TBARS formation. Selections 02/96 and 03/001 had the highest antioxidant activity in the TBARS assay. In addition, except for selection 99, the blackberry selections showed higher antioxidant activities in this assay than the fruit cultivars. These data are interesting because the new selections developed by Embrapa seem to have greater antioxidant potential.

No differences were found in the antioxidant activity of phenolic extracts between Cherokee fruits from harvest 2007 and 2009, regardless of the antioxidant assay evaluated.

The ability to scavenge reactive oxygen species depends on the type of antioxidant. Fruits contain many different antioxidant components (Wang et al., 1996) and their relative quantities may also vary (Beekwilder et al., 2005), affecting the total antioxidant capacity of fruits.

We found significant differences in the total phenolic content among the genotypes evaluated, which can be explained by genetic differences. Other authors found lower phenolic content in blackberries (about 0.21 g gallic acid/100 g), but they evaluated different genotypes (Wang et al., 2008). Only Tupy, Guarani and Cherokee cultivars had been previously evaluated. Tupy and Guarani cultivars, when grown in a tropical climate (central region of Brazil), presented slightly lower phenolic content (0.37 and 0.43 g gallic acid/100 g of fruit, respectively; Hassimoto et al., 2008) when compared to the results of the present study. Similar results were found for Cherokee cultivars grown in Turkey that had 0.30 g gallic acid/100 g fruit (Koca and Karadeniz, 2009). Thus, differences from previous studies may be due to soil and climate differences. In fact climate changes were shown to affect the phenolic content of blackberries (Reyes-Carmona et al., 2005). However, we found no significant difference in the total phenolic content between Cherokee fruits from harvest 2007 and 2009.



Similar results were found by Dai et al. (2009) who studied Hull blackberries from different years.

Quercetin was the only phenolic compound identified at relevant amount in the phenolic extracts of our blackberry samples. We found a wide variation in the amount of quercetin in blackberries from different genotypes, as previously reported (Hassimotto et al., 2008). Among the cultivars evaluated in the present study, only Tupy and Guarani had been previously studied and showed higher quercetin values (7.8 and 13.3 mg per 100 g, respectively; Hassimotto et al., 2008) than those found in this study. However, the amount of quercetin found in our study is higher than that reported by the USDA database (2007) for blackberry.

The phenolic extracts of blackberries from the temperate climate region of Brazil had very low ascorbic acid levels. Accordingly, Hassimotto et al. (2008) found only the oxidized form of vitamin C (L-dehydroascorbic acid) in Tupy and Guarani cultivars grown in a tropical climate region of Brazil (Hassimotto et al., 2008). This finding was attributed to the fast oxidation of vitamin C and absence of de novo synthesis of ascorbic acid during development or ripening (Hassimotto et al., 2008).

Several authors demonstrated a strong positive correlation between total phenolic content and the antioxidant capacity of fruits (Dai et al., 2009; Sariburn et al., 2010; Wang and Lin, 2000; Reyes-Carmona, 2005; Vision et al., 1998; Bagetti et al., 2011) including blackberries (Reyes-Carmona et al., 2005; Dai et al., 2009). The correlations found between bioactive compounds and the antioxidant activity of phenolic extracts suggest that phenolic compounds are the major responsible for the antioxidant activity in the DPPH, FRAP and TBARS assays. However, quercetin which was the only phenolic compound that we could identify and quantify seems not contribute to the antioxidant activity of the phenolic extracts in these assays (no significant correlation). Thus, it is possible the other phenolic compounds

that appeared to be at much higher concentration than quercetin in the chromatograms, but could not be identified, are actually the major responsible for this activity.

The quercetin content of phenolic extracts was negatively correlated to the IC<sub>50</sub> values for  $\beta$ -carotene bleaching, indicating that quercetin has a major contribution to this antioxidant activity. Although quercetin is a phenolic compound no relationship was found between total phenolic content and the antioxidant activity in the  $\beta$ -carotene bleaching assay, possibly because other phenolic compounds that are quantified in the total phenolic assay, but were not identified in HPLC analysis, have no effect on this assay. The antioxidant activity of flavonoids is closely linked to its structure, such as the presence of an *o*-dihydroxy or catechol group in the B ring, the conjugation of the B-ring to the 4-oxo group via the 2,3-double bond, the 3- and 5- OH groups with the 4-oxo group (Silva et al., 2002). Quercetin shows all the structural characteristics mentioned above, which may explain the high antioxidant capacity of extracts of different genotypes of blackberry in the  $\beta$ -carotene bleaching system.

Regardless of the antioxidant assay evaluated ascorbic acid seems to play no role in the antioxidant activity of phenolic extracts from blackberry genotypes, possibly due to its very low concentration in the blackberry extracts.

The antioxidant capacity of the anthocyanic extracts was evaluated only by the FRAP, DPPH and TBARS assays. In the FRAP assay, the selections 07/001, 03/001 and 02/96 and the Cherokee cultivar from 2007 harvest had the greatest ferric reducing power. FRAP values found were lower than those previously reported for commercial blackberry cultivars from USA (Siriwoharn et al., 2004), which may be due to several factors such as the differences in the method used to extract compounds, climatic or genetic differences because these authors analyzed different genotypes. In the DPPH assay, all extracts from the harvest 2007 had greater antioxidant capacity than the extracts from fruits harvested in 2009. In contrast, the genotypes from the 2009 harvest year (Cherokee, Xavante and selection 99) had the greatest

potency to inhibit lipid oxidation in the TBARS assay, followed by selection 02/96, Tupy and Cherokee 2007 cultivars.

Several health benefits of purple fruits, including antioxidant effects, are linked to the presence of anthocyanins (Ramirez et al., 2005; Dai et al., 2009). The presence and amount of such pigments are related to various factors including the genotype (Howard et al., 2003), growing temperature (Wang and Zheng, 2001), growing season, maturity at harvest and environmental stress (Reyes-Carmona et al., 2005). Selection 07/001 had the highest total anthocyanin content, followed by selections 03/001 and 02/96 and cultivars Guarani and Tupy. Other authors found higher amounts of anthocyanins (116 - 792 mg/100 g fruit), however, they studied other genotypes (Tosun et al., 2008) that were grown in different regions (Hassimoto et al., 2008; Tosun et al., 2008) from ours. Different from the phenolic extracts, the anthocyanic extracts had relevant amounts of ascorbic acid, especially those from Guarani, Tupy and Cherokee 2007 cultivars.

The correlation tests revealed that anthocyanins are the major responsible for the FRAP and DPPH antioxidant activity of the anthocyanic extracts from blackberries. In addition, ascorbic acid also contributed to the DPPH antioxidant activity of these extracts. In contrast, the antioxidant activity assessed by the TBARS assay had no relationship with total anthocyanins or ascorbic acid content. The antioxidant potential of anthocyanins is affected by differences in their structural characteristics (Zheng and Wang, 2003). Thus, differences in the composition and antioxidant activity of anthocyanins among the various genotypes evaluated could explain the absence of relationship between the total anthocyanin content and the TBARS assay.

For most genotypes the antioxidant capacity (DPPH, FRAP and TBARS values) of anthocyanic extracts were usually higher than that of the phenolic extracts. These data suggest a greater involvement of anthocyanins in the antioxidant activity of blackberries. In addition,

these results may be also related to the method of extraction, because the anthocyanic extract was obtained after exhaustive extraction, which did not occur with the extraction of phenolic compounds. Concerning the genotypes studied, the selection 02/96 showed one of the highest antioxidant capacity assessed by the four different methods and was among the genotypes that had higher content of total phenolics and anthocyanins.

## **5. Conclusion**

Regarding the phenolic extracts, selections 02/96 and 07/001 had higher antioxidant activity than the cultivars in most assays, and this activity was partially correlated to the higher amount of total phenolics in these samples, indicating that phenolic compounds are probably the major responsible for the antioxidant activity in the DPPH, FRAP and TBARS assays. Quercetin seems to be responsible for the antioxidant activity of blackberry phenolic extracts in the  $\beta$ -carotene bleaching assay. Concerning the anthocyanic extracts, selection 02/96, Tupy and Cherokee cultivars from harvest 2007 had higher antioxidant activity in most assays. Anthocyanins appear to be the major responsible for the antioxidant activity of anthocyanic extracts in the DPPH and FRAP assays, although ascorbic acid also contributed to the DPPH antioxidant activity. It was not possible to identify the compound responsible for the TBARS antioxidant activity of anthocyanic extracts. Our results revealed that blackberries from different genotypes can be considered as good sources of bioactive compounds with high antioxidant activity. The new blackberry selections developed by Embrapa, especially selection 02/96 appears to have higher antioxidant activity than the commercial cultivars cultivated in the southern Brazil. Thus, this selection appears to be promising for nutritional and health purposes.

## **Acknowledgements**

G.E. Hirsch was the recipient of a CNPq Master Degree Fellowship. T. Emanuelli and A.T. Henriques were the recipients of CNPq Research Fellowships. This work was supported by Embrapa Clima Temperado, Edital Capes no. 11/2009 (Pró-Equipamentos Institucional) and Edital Casadinhos (FAPERGS/CAPES).

## References

- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., 2001. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, 127, 183-198.
- Antunes, L.E.C., 2002. Blackberry: a new crop option to Brazil. *Cienc. Rural*, 32, 151-158.
- Bagetti, M., Facco, E.M.P., Rodrigues, D.B., Vizzotto, M., Emanuelli, T., 2009. Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. *Cienc. Rural*, 39, 2504-2510.
- Bagetti, M., Facco, E.M.P., Piccolo, J., Hirsch, G.E., Rodriguez-Amaya, D.B., Kobori, C.N., Vizzotto, M., Emanuelli, T., 2011. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). *Ciencia Tecnol. Alime*. In press.
- Beekwilder, J., Jonker, H., Meesters, P., Hall, R.D., van der Meer, I.M., de Vos, C.H.R., 2005. Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3313-3320.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239, 70-76.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.*, 28, 25-30.
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56, 317-333.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 52, 302-310.

- Cho, M.J., Howard, L.R., Prior, R.L., Clark, J.R., 2005. Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.*, 85, 2149-2158.
- Cuevas-Rodríguez, E.O., Yousef, G.G., García-Saucedo, P.A., López-Medina, J., Paredes-López, O., Lila, M.A., 2010. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated Mexican blackberries (*Rubus* spp). *J. Agric. Food Chem.*, 58, 7458-7464.
- Dai, J., Gupte, A., Gates, L., Mumper, R.J., 2009. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food Chem. Toxicol.*, 47, 837-847.
- Dai, J., Patel, J.D., Mumper, R.J., 2007. Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties. *J. Med. Food*, 10, 258-265.
- Dugo, P., Mondello, L., Errante, G., Zappia, G., Dugo, G., 2001. Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high-performance liquid chromatography with electrospray ionization detection. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3987-3992.
- Elisia, I.; Hu, C.; Popovich, D.; Kitts, D., 2007. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. *Food Chem.*, 101, 1052-1058.
- Escarpa, A., Gonzalez, M.C., 2001. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Anal. Chim. Acta*, 427, 119-127.
- Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I., Lajolo, F.M., 2005. Antioxidant activity of dietary vegetables, fruits and commercial frozen fruits pulp. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2928-2935.

- Hassimotto, N.M.A., Mota, R.V., Cordenunsi, B.R., Lajolo, F.M., 2008. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus sp.*) grown in Brazil. *Ciencia Tecnol. Alime.*, 28, 702-708.
- Howard, L.R., Clark, J.R., Brownmiller, C., 2003. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J. Sci. Food Agric.*, 83, 1238-1247.
- Jennings, D.L., Daybeny, H.A., Moore, J.N., 1990. Blackberries and raspberries. *Acta Hortic.*, 290, 330-389.
- Kähkönen, M.P., Heinonen, M., 2003. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 628-633.
- Kang, H.J., Chawla, S.P., Jo, C., Kwon, J.H., Byun, M.W., 2006. Studies on development of functional power of citrus peel. *Bioresour. Technol.*, 97, 614-620.
- Kirakosyan, A., Kauffman, P., Warber, S., Zick, S., Aaronson, K., Bolling, S., Chanc, S.C., 2004. Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. *Physiol. Plant.*, 121, 182-186.
- Koca, I., Karadeniz, B., 2009. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Sci. Hortic.*, 121, 447-450.
- Koponen, J.M.; Happonen, A.M.; Mattila, P.H.; Torronen, A.R., 2007. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 1612-1619.
- Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J., Fett, R., 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia Tecnol. Alime.*, 25, 726-732.
- Lees, D.H., Francis, F.J., 1972. Standardization of pigment analyses in cranberries. *Hortscience*, 7, 83-84.

- Martins, D.M., Torres, B.G., Spohr, P.R., Machado, P., Bonacoroso, H.G., Zanatta, N., Martins, M.A.P., Emanuelli, T., 2009. Antioxidant potential of new pyrazoline derivatives to prevent oxidative damage. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 104, 107-112.
- Mazza, G., Miniati, E., 1993. Anthocyanins and cardiovascular health. Boca Raton, FL: CRC Press, Boca Raton.
- Miller, H.E., 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45, 91.
- Mooler, J.K.S., Madsen, H.L., Aatonen, T., Skibsted, L.H., 1999. Dittany (*Oridanum dictamnus*) as source of water extractable antioxidant. *Food Chem.*, 64, 215-219.
- Moore, J.N., 1984. Blackberry breeding. *Hortscience*, 19, 183-185.
- Moure, A., Quimica, E., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Lema, J.M., 2000. Evaluation of extracts from *Gevuina avelana* Hulls as antioxidants. *J. Agric. Chem.*, 48, 3890-3897.
- Ochmian, I., Oszmiański, J., Skupień, K., 2009. Chemical composition, phenolics, and firmness of small black fruits. *J. Appl. Bot. Food Qual.*, 83, 64-69.
- Odriozola-Serrano, I., Hernández-Jover, T., Martín-Bellosa, O., 2007. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chem.*, 105, 1151-1158.
- Pellegrini, N., Colombi, B., Salvatore, S., Brenna, O.V., Galaverna, G., Del Rio, D., Bianchi, M., Bennett, R.N., Brighenti, F., 2007. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. *J. Sci. Food Agric.*, 87, 103-111.
- Ramírez, M.R., Izquierdo, I.A., Bassols-Raseira, M.C., Zuanazzi, J.A.; Barros, D.M., Henriques, A.T., 2005. Effect of lyophilized *Vaccinium* berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. *Pharm. Res.*, 52, 457-462.



- Reverberi, M., Picardo, M., Ricelli, A., Camera, E., Fanelli, C., Fabbri, A.A., 2001. Oxidative stress, growth factor production and budding in potato tubers during cold storage. *Free Radic. Res.*, 35, 833-841.
- Reyes-Carmona, J., Yousef, G.G., Martínez-Peniche, R., Lila, M.A., 2005. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus sp.*) produced in different climatic regions. *J. Food Sci.*, 70, 497-503.
- Sánchez-Mata, M.C., Cámara-Hurtado, M., Díez-Marqués, C., Tirija-Isasa, M.E., 1999. Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Eur. Food Res. Technol.*, 210, 220-225.
- Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., Uylaşer, V., 2010. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *J. Food Sci.*, 75, 328-335.
- Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130, 2073-2085.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H.S., Heber, D., 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9329-9339.
- Silva, M.M., Santos, M.R., Caroço, G., Rocha, R., Justino, G., Mira, L. 2002. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Radic. Res.*, 36, 1219-1227.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.Jr., 1965. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.

- Siriwoharn, T., Wrolstad, R.E., Finn, C.E., Pereira, C.B., 2004. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus L. Hybrids*) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 8021-8030.
- Tosun, I., Ustun, N.S., Tekguler, B., 2008. Physical and chemical changes during ripening of blackberry fruits. *Sci. Agric.*, 65, 87-90.
- USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 2.1. (2007). <<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6231>> last date visited 16.08.2010.
- Vison, J.A., Hao, Y., Su, X., Zubik, L., 1998. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4113-4117.
- Wang, H., Cao, G., Prior, R.L., 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 701-705.
- Wang, S.Y., Bowman, L., Ding, M., 2008. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus sp.*) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chem.*, 107, 1261-1269.
- Wang, S.Y., Lin, H.S., 2000. Antioxidant activity in fruit and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry is affected by cultivar and maturity. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 140-146.
- Wang, S.Y., Zheng, W., 2001. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4977-4982.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L., 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4069-4075.
- Zheng, W., Wang, S.Y., 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 502-509.

**Table 1**

Antioxidant activity of blackberry phenolic extracts.

Samples	Harvest year	FRAP (mmol trolox/100 g)	DPPH (mmol trolox/100 g)	IC <sub>50</sub> (µg of phenolics/mL)	
				Betacarotene bleaching	TBARS
Selection 07/001	2007	4.2 ± 0.2 <sup>ab</sup>	0.81 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.5 <sup>ab</sup> (2.0 – 6.1)	19.5 <sup>bc</sup> (10.8 – 35.3)
Selection 03/001	2007	2.8 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>bc</sup>	6.3 <sup>ab</sup> (3.0 – 13.3)	7.9 <sup>cd</sup> (4.5 – 13.9)
Selection 02/96	2007	4.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.5 <sup>ab</sup> (2.5 – 12.0)	1.0 <sup>d</sup> (0.1 – 7.2)
Guarani	2007	1.7 ± 0.3 <sup>d</sup>	0.47 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.7 <sup>c</sup> (0.5 – 1.0)	44.3 <sup>ab</sup> (22.1 – 88.9)
Tupy	2007	2.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>c</sup>	4.2 <sup>ab</sup> (1.6 – 11.3)	78.0 <sup>a</sup> (40.2 – 151.4)
Cherokee	2007	1.8 ± 0.3 <sup>d</sup>	0.20 ± 0.02 <sup>bc</sup>	5.7 <sup>ab</sup> (2.0 – 16.0)	40.7 <sup>ab</sup> (21.7 – 76.2)
Cherokee	2009	1.6 ± 0.0 <sup>d</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>bc</sup>	8.3 <sup>a</sup> (3.9 – 17.5)	40.2 <sup>ab</sup> (17.9 – 90.0)
Selection 99	2009	2.7 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>bc</sup>	7.7 <sup>a</sup> (3.6 – 15.9)	> 60.0 <sup>a</sup>
Xavante	2009	3.8 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.8 <sup>bc</sup> (0.9 – 3.4)	52.3 <sup>ab</sup> (33.8 – 81.0)

FRAP and DPPH values are expressed as means ± standard deviations (n=3), while IC<sub>50</sub> values are means (confidence interval) (n=3); DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; FRAP: ferric reducing antioxidant power; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances. Values that have no common superscript letter (a,b,c,d) within the same column are significantly different (p<0.05).

**Table 2**

Composition of blackberry phenolic extracts.

Samples	Harvest	Phenolic content		Ascorbic acid
	Year	Total phenolics (g gallic acid/100 g)	Quercetin (mg/100 g)	( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )
Selection 07/001	2007	$0.99 \pm 0.06^a$	$2.5 \pm 0.4^c$	< LOQ <sup>b</sup>
Selection 03/001	2007	$0.45 \pm 0.10^b$	$1.7 \pm 0.3^c$	< LOQ <sup>b</sup>
Selection 02/96	2007	$1.02 \pm 0.08^a$	$2.8 \pm 0.5^c$	< LOQ <sup>b</sup>
Guarani	2007	$0.44 \pm 0.11^b$	$6.0 \pm 0.3^a$	< LOQ <sup>b</sup>
Tupy	2007	$0.64 \pm 0.10^{ab}$	$3.9 \pm 0.1^b$	< LOQ <sup>b</sup>
Cherokee	2007	$0.52 \pm 0.26^b$	$2.6 \pm 0.3^c$	< LOQ <sup>b</sup>
Cherokee	2009	$0.34 \pm 0.10^b$	-----	< LOQ <sup>b</sup>
Selection 99	2009	$0.36 \pm 0.07^b$	-----	$64.7 \pm 1.4^a$
Xavante	2009	$0.40 \pm 0.08^b$	-----	$74.5 \pm 11.2^a$

Results are expressed as means  $\pm$  standard deviations (n=3). Values that have no common superscript letter (a,b,c) within the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ). LOQ = Limit of quantification ( $34.7\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ ).

**Table 3**

Antioxidant activity of blackberry anthocyanin extracts.

Samples	Harvest	FRAP	DPPH	TBARS
	Year	(mmol trolox/100 g)	(mmol trolox/100 g)	IC <sub>50</sub> (µg anthocyanins/mL)
Selection 07/001	2007	4.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.01 <sup>a</sup>	17.40 <sup>a</sup> (10.70 – 28.30)
Selection 03/001	2007	4.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.02 <sup>a</sup>	28.38 <sup>a</sup> (14.66 – 54.93)
Selection 02/96	2007	5.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.21 <sup>b</sup> (0.62 – 2.35)
Guarani	2007	3.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	1.49 ± 0.08 <sup>a</sup>	23.99 <sup>a</sup> (10.56 – 54.51)
Tupy	2007	3.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.53 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.10 <sup>b</sup> (0.32 - 3.79)
Cherokee	2007	5.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.52 <sup>b</sup> (0.62 – 1.71)
Cherokee	2009	1.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.47 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.16 <sup>c</sup> (0.09 - 0.28)
Selection 99	2009	2.5 ± 0.2 <sup>bc</sup>	0.51 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.06 <sup>d</sup> (0.04 - 0.08)
Xavante	2009	3.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.45 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.07 <sup>cd</sup> (0.03 - 0.16)

FRAP and DPPH values are expressed as means ± standard deviations (n=3), while IC<sub>50</sub> values are means (confidence interval) (n=3); DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; FRAP: ferric reducing antioxidant power; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances. Values that have no common superscript letter (a,b,c,d) within the same column are significantly different (p<0.05).

**Table 4**

Composition of blackberry anthocyanic extracts.

Samples	Harvest Year	Total anthocyanins (mg/100 g)	Ascorbic acid (mg/100 g)
Selection 07/001	2007	100.4 ± 3.4 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.3 <sup>b</sup>
Selection 03/001	2007	82.9 ± 12.5 <sup>ab</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>b</sup>
Selection 02/96	2007	85.3 ± 2.7 <sup>ab</sup>	2.0 ± 0.1 <sup>b</sup>
Guarani	2007	78.2 ± 14.6 <sup>ab</sup>	3.5 ± 0.2 <sup>a</sup>
Tupy	2007	75.6 ± 0.3 <sup>ab</sup>	3.4 ± 0.0 <sup>a</sup>
Cherokee	2007	68.8 ± 10.0 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.2 <sup>a</sup>
Cherokee	2009	27.7 ± 1.0 <sup>c</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>c</sup>
Selection 99	2009	27.9 ± 3.8 <sup>c</sup>	2.2 ± 0.1 <sup>b</sup>
Xavante	2009	24.0 ± 0.5 <sup>c</sup>	1.1 ± 0.0 <sup>c</sup>

Results are expressed as means ± standard deviations (n=3). Values that have no common superscript letter (a,b,c) within the same column are significantly different (p<0.05).

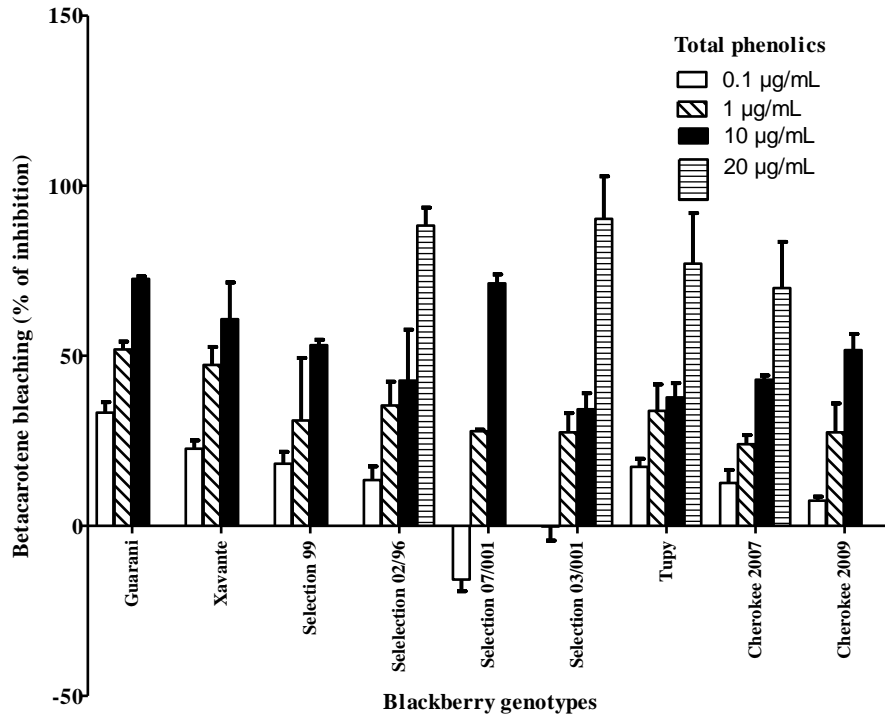
**Figure captions:**

**Fig. 1.** Inhibition of betacarotene bleaching (A) and lipid oxidation in fish homogenate (B) by blackberry phenolic extracts. Results are expressed as means  $\pm$  standard deviations (n=3). Two-way ANOVA revealed a significant phenolic concentration x blackberry genotype interaction on the inhibition of  $\beta$ -carotene bleaching and lipid oxidation ( $p < 0.05$ ). The  $IC_{50}$  values are shown in Table 1.

**Fig. 2.** Inhibition of lipid oxidation in fish homogenate by blackberry anthocyanic extracts. Results are expressed as means  $\pm$  standard deviations (n=3). Two-way ANOVA revealed a significant anthocyanin concentration x blackberry genotype interaction on the inhibition of lipid oxidation ( $p < 0.05$ ). The  $IC_{50}$  values are shown in Table 3.

Figure 1

(A)



(B)

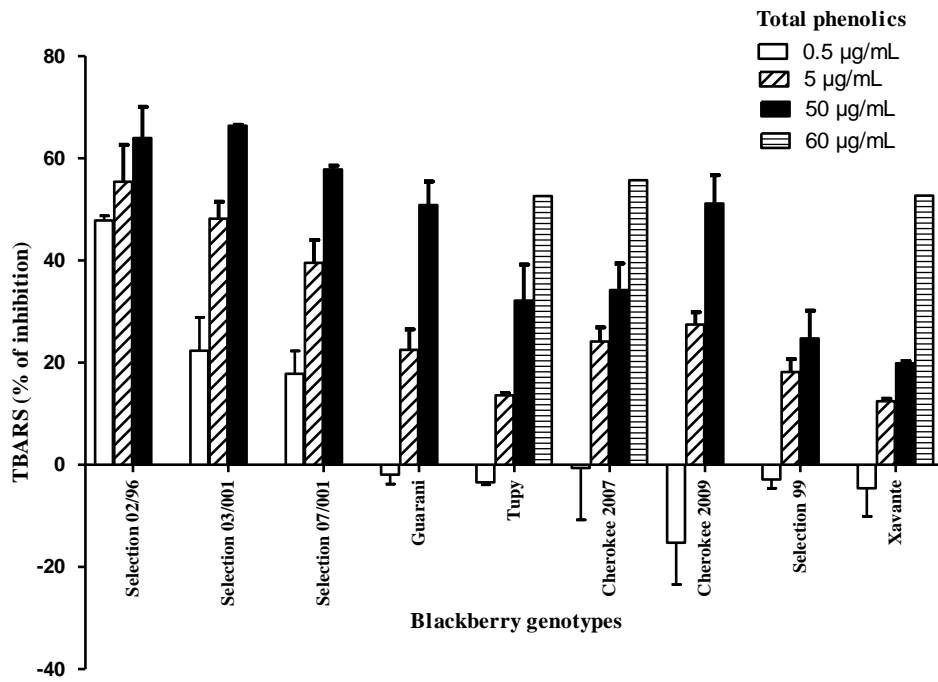
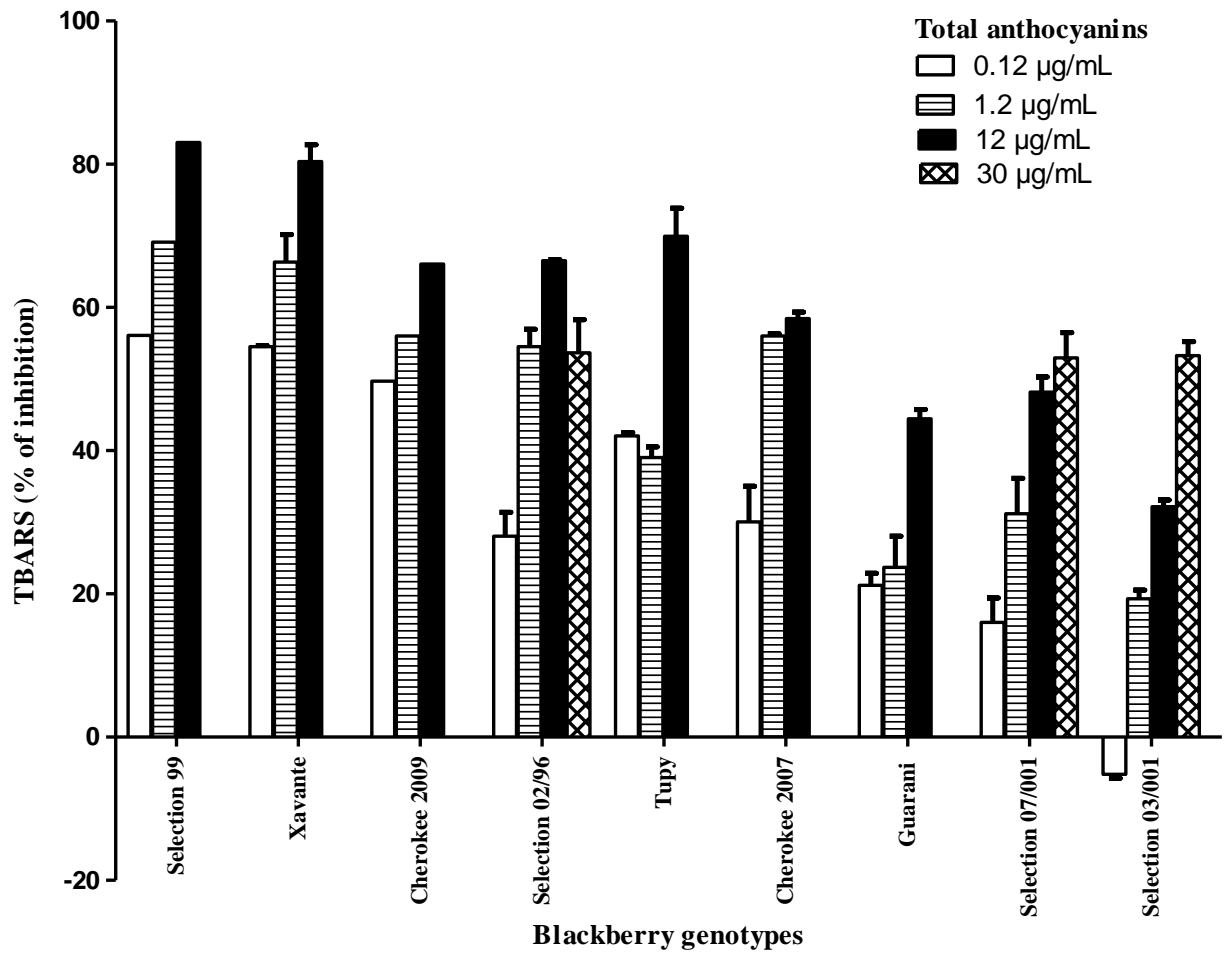




Figure 2



## 5 DISCUSSÃO

Visando estudar as características físico-químicas das amoras-pretas cultivadas no Rio Grande do Sul e a capacidade antioxidante dos extratos dos diferentes genótipos de amora-preta (*Rubus sp.*), foram avaliados parâmetros de qualidade, composição centesimal, perfil lipídico, teor e composição de fenólicos e teor de antocianinas dos extratos e capacidade antioxidante nos ensaios de FRAP, DPPH, inibição da oxidação lipídica (TBARS) e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.

Em relação aos parâmetros de qualidade, os diferentes genótipos apresentaram valores de pH baixos (2,80 – 3,08), o que já era esperado devido as suas características naturais de sabor ácido a ácido-doce. No mesmo sentido, as amoras avaliadas se mostraram propícias para a industrialização, pois apresentaram valores de pH dentro da faixa considerada ótima para formação de gel (3,0 – 3,2; CETEC, 1985), dispensando, assim, o uso de aditivos como os acidulantes, reduzindo o custo de produção da geléia. As características de acidez da fruta também mostram seus atributos de qualidade, uma vez que este fator é importante na manutenção das características sensoriais da mesma.

Em relação às características físico-químicas, os diferentes genótipos de amora-preta mostraram-se com teores intermediários de carboidratos, uma vez que apresentaram valores de SST entre 7,3 - 10,2 °Brix, um indicativo do teor de açúcares. Essa característica é importante, pois confere sabor agradável à fruta e aos produtos dela derivados. Teores de açúcares intermediários associados com teores adequados de acidez conferem as amoras analisadas características ideais para a industrialização da mesma (sucos, polpas, geléias). Além disso, as amoras mostraram-se boas fontes de fibras (5,5 – 5,8 %), característica interessante uma vez que as mesmas desempenham uma série de efeitos benéficos para a saúde, como a regularização do funcionamento intestinal e redução do colesterol plasmático (CAVALCANTI, 1989). O teor de proteínas e lipídios mostrou-se baixo nas amoras analisadas.

A cor é um importante parâmetro para produtores e consumidores, pois indica se o fruto apresenta ou não as condições ideais para comercialização e consumo. Porém, a cor, na maioria dos casos, não contribui para um aumento efetivo no valor nutritivo ou qualidade do produto (CHITARRA e CHITARRA, 1990). Mas, em geral, consumidores têm preferência por frutos de cor forte e brilhante. Em relação ao ponto de colheita, este é determinado

quando o fruto estiver totalmente preto, devendo a colheita ser realizada a cada dois a três dias (RASEIRA et al., 1984). As amoras apresentaram valores de  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ , croma e ângulo de matiz variando de 18,7 - 30,8; 4,5 - 11,2; 27,5 - 31,4; 19,2 - 32,8 e 13,2 - 19,8, respectivamente. Em todos os parâmetros de cor avaliados, com exceção de  $L^*$ , a seleção 03/001 apresentou menor tendência ao vermelho (maior ângulo de cor), mas maior intensidade de cor (maior croma) que a Tupy, o que possivelmente aumentaria a sua aceitação pelos consumidores.

No que se refere ao perfil de ácidos graxos, os ácidos predominantes em todos os genótipos de amora-preta estudados foram o ácido linoléico (C18:2n6), oléico (C18:1n9c) e palmítico (C16:0). Além destes, foram encontrados nas frutas analisadas, também, o ácido mirístico (C14:0), esteárico (C18:0) e linolênico (C18:3n3), em menores quantidades. Os teores dos ácidos graxos variaram entre os diferentes genótipos. O ácido oléico apresentou menor concentração nas seleções em relação as cultivares Guarani e Cherokee. Este último ácido graxo é considerado favorável para a saúde, sendo que dietas que apresentam quantidades elevadas de ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oléico, são capazes de reduzir a concentração de colesterol plasmático, de LDL e de triglicerídeos (KRIS-ETHERTON et al., 1999), e a substituição de ácidos graxos saturados por ácidos graxos insaturados com configuração *cis* reduzem o risco de doenças da artéria coronária (MENSINK et al. 2003), porém, devido ao baixo teor de lipídios na fruta, ela não poderia ser considerada uma excelente fonte desses ácidos graxos, apesar de apresentarem uma boa proporção destes em sua composição. As diferenças nas concentrações dos ácidos oléico e linoléico nas amoras-pretas podem estar relacionadas aos diferentes genótipos.

Em relação aos compostos bioativos dos extratos fenólicos, as seleções 07/001 e 02/96 apresentaram os maiores conteúdos de fenólicos totais, embora todas as amostras tenham mostrado alto teor de compostos fenólicos totais, em geral, maior do que encontrado por outros autores (HASSIMOTO et al., 2008; KOKA e KARADENIZ, 2009) e em outras frutas como a pitanga (*Eugenia uniflora*) (BAGETTI et al., 2011) e araçá (*Psidium guineensis Sw.*) (GENOVESE et al., 2008). Na avaliação da composição dos compostos bioativos presentes nos extratos fenólicos, foram encontrados ácido elágico, ácido vanílico e quercetina, porém somente foi possível quantificar a quercetina. Este composto, conhecido por sua atividade antioxidante, parece ter contribuído com a capacidade antioxidante medida pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico ( $r^2 = -0,844$ ;  $p < 0,05$ ). Quantidades traços de ácido ascórbico foram encontradas nos extratos fenólicos, em geral, com exceção da seleção 99 ( $64,7 \pm 1,4 \mu\text{g}/100$

g) e da cultivar Xavante ( $74,5 \pm 11,2 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ), porém, ele provavelmente não contribuiu para a atividade antioxidante dos extratos (sem correlação significativa). Além disso, o conteúdo de fenólicos totais também mostrou forte correlação positiva com os métodos FRAP ( $r^2=0,746$ ;  $p<0,05$ ) e DPPH ( $r^2=0,785$ ;  $p<0,05$ ) e correlação negativa com o método TBARS ( $r^2 = -0,565$ ;  $p<0,05$ ), indicando que esses compostos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante nestes métodos.

Em relação ao extrato de antocianinas, todas as amostras mostraram altos conteúdos de antocianinas, o que era esperado uma vez que esses pigmentos são característicos da fruta e conferem a cor característica das mesmas. Ao contrário dos extratos fenólicos, altos teores de ácido ascórbico foram encontrados nos extratos antociânicos e provavelmente este composto teve participação na atividade antioxidante desse extrato medida pelo método DPPH ( $r^2 = 0,674$ ;  $p<0,05$ ). As antocianinas também contribuíram para a atividade antioxidante da fruta, uma vez que apresentaram correlação positiva intensa no método DPPH ( $r^2 = 0,921$ ;  $p<0,05$ ). Estes pigmentos também foram, provavelmente, os principais responsáveis pela atividade antioxidante medida pelo método FRAP ( $r^2=0,728$ ;  $p<0,05$ ).

A avaliação dos extratos antociânicos dos genótipos de amora-preta mostrou que a seleção 02/96 e as cultivares Tupy e Cherokee da safra de 2007 tiveram a maior atividade antioxidante em todos os testes, já nos extratos fenólicos, as seleções 02/96 e 07/001 se destacaram com a maior atividade antioxidante representada na maioria dos testes. A atividade antioxidante dos extratos antociânicos foi maior do que a dos extratos fenólicos nos testes de DPPH e FRAP indicando que esses compostos poderiam estar contribuindo com grande parte da atividade antioxidante encontrada na fruta “*in natura*”.

Na cultivar Cherokee, não foram encontradas diferenças significativas no conteúdo de compostos fenólicos totais ou quercetina dos extratos fenólicos, nem nos testes antioxidantes, entre as safras de 2007 e 2009. Já nos extratos antociânicos, a cultivar Cherokee da safra de 2007 apresentou maior conteúdo de antocianinas e ácido ascórbico do que a cultivar Cherokee da safra de 2009 e apresentou, também, maior atividade antioxidante, indicando que provavelmente fatores relacionados ao clima (chuva, horas de sol) afetam mais o conteúdo de antocianinas do que o conteúdo de fenólicos totais.

Neste trabalho, nós optamos por utilizar quatro métodos antioxidantes diferentes pois, um único ensaio antioxidante não é capaz de refletir todos os antioxidantes em uma mistura ou em um sistema complexo, devido aos múltiplos mecanismos e características das reações

(LI e WANG, 2009). Assim, cada método pode nos fornecer uma estimativa da atividade antioxidante que é dependente do tipo de ensaio selecionado e das condições experimentais. Portanto, o uso dos diferentes métodos nos ajudou a identificar quais compostos poderiam ser responsáveis pela atividade antioxidante nos extratos selecionados, e nos forneceram uma idéia do modo de ação desses compostos, uma vez que os métodos são baseados em princípios diferentes.

Cada método apresenta vantagens e limitações. DPPH é um método rápido e prático, mas ele não reage com flavonóides, que não contêm grupos OH no anel B (YOKOZAWA et al., 1998), ou com ácidos aromáticos, contendo apenas um grupo OH (VON GADOV, JOUBERT e HANSMANN, 1997). Ele também avalia apenas o poder redutor de antioxidantes, que doam um elétron, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). O ensaio FRAP também mede a capacidade de redução de compostos fenólicos (ROGINSKY e LISSI, 2005). O ensaio de branqueamento do  $\beta$ -caroteno (sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico) avalia a inibição dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico e avalia compostos pró-oxidantes, ao contrário do método DPPH (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). No método de TBARS, um composto é oxidado com a adição de um íon de metal de transição e, em seguida, a extensão da oxidação lipídica é determinado pela adição de TBA (ácido tiobarbitúrico). A oxidação é inibida pela adição de um antioxidante e, portanto, uma redução na absorbância é vista (ANTOLOVICH et al., 2001).

Embora amplamente utilizada na triagem de compostos antioxidantes, o DPPH e ensaio FRAP são realizados em condições que não são encontradas em alimentos ou no organismo humano (pH, radicais livres sintéticos, entre outros fatores). Em contrapartida, o branqueamento de  $\beta$ -caroteno e os ensaios de TBARS, são realizados em condições mais semelhantes às encontradas em alimentos e, assim, nos dão uma idéia mais clara das propriedades antioxidantes dos compostos testados, por isso foram utilizados neste trabalho.

Apesar dos diferentes genótipos analisados apresentarem bastante semelhança entre si quanto ao valor nutricional, as seleções desenvolvidas na Embrapa Clima Temperado destacaram-se na atividade antioxidante. Especialmente se destacou a seleção 02/96, que teve alta atividade antioxidante nos extratos fenólicos e antociânicos pelos diferentes métodos. Esse fato é importante, pois um dos objetivos do programa de melhoramento genético desenvolvido pela Embrapa Clima Temperado (Pelotas – RS) é melhorar a qualidade

nutricional e a aparência (firmeza, cor, brilho) das frutas de amora-preta (ANTUNES e RASEIRA, 2004). Então, essas seleções aparecem como promissoras fontes de compostos nutricionais e promotoras da saúde, além de serem atrativas perante o consumidor, melhorando sua aceitação no mercado. Além disso, a alta atividade antioxidante apresentada pelos extratos fenólicos e antociânicos das seleções estudadas mostra que elas podem ser usadas como fonte de compostos antioxidantes da dieta, oferecendo, assim, uma proteção adicional na prevenção de doenças relacionadas com stress oxidativo.

Já em relação as cultivares, elas apresentaram maiores teores de cinzas (um indicativo do conteúdo de minerais), SST (indicativo do teor de açúcares), ácido oléico e ácido ascórbico, e dentre elas, podemos destacar a cultivar Cherokee com alto teor de compostos bioativos importantes para manutenção da saúde como o ácido oléico, fenólicos totais e antocianinas. Além disso, os teores mais elevados de açúcares (SST entre 10,2 – 8,4) e acidez apropriada (pH 3,06 – 2,78) mostrados pelas cultivares, indicam que estas frutas apresentam características ideais para serem usadas na fabricação de produtos industrializados, agregando, assim, maior valor as amoras-pretas.

Então, sendo o Brasil um grande produtor de amora-preta, principalmente o estado do Rio Grande do Sul, podemos propor que as amoras-pretas poderiam ser usadas para elaboração de outros produtos além da fruta *in natura*, como polpas para sucos, pós para sorvetes, geléias, sucos naturais, entre outros, pois demonstraram ser uma rica fonte de compostos fitoquímicos com alta atividade antioxidante, além dos nutrientes normalmente presentes em outras frutas como fibras, carboidratos e vitaminas.

## 6 CONCLUSÕES

- Os diferentes genótipos de amora-preta cultivados na Embrapa Clima Temperado apresentaram carboidratos e fibras como nutrientes principais, sendo a maioria destes constituídos, possivelmente, por açúcares, que contribuem para o seu sabor característico, além de acidez ideal para industrialização, demonstrando assim, aptidão para ser comercializada na forma de produtos industrializados.
- Os diferentes genótipos de amora-preta apresentaram bom valor nutricional, podendo ser usados como fonte de nutrientes “*in natura*”, principalmente fibras e açúcares, além de compostos bioativos com grande poder antioxidante.
- As novas seleções desenvolvidas pela Embrapa Clima Temperado apresentaram maior capacidade antioxidante em relação às cultivares comerciais, especialmente a seleção 02/96, parecendo ser promissora para fins nutricionais e saúde, uma vez que os antioxidantes previnem uma série de disfunções do nosso organismo.
- As cultivares Cherokee das safras de 2007 e 2009 somente apresentaram diferenças no conteúdo de compostos bioativos e capacidade antioxidante nos extratos de antocianinas indicando que os fatores climáticos afetam mais as antocianinas do que os compostos fenólicos e conseqüentemente, sua atividade antioxidante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A. E.; ROOZEN, J. P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. **Food Chemistry**, v. 64, p. 323-329, 1999.

ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M. (2006). The anthocyanins. In O. M. Andersen & K. R. Markham (Eds.), *Flavonoids (2nd ed.. Chemistry, biochemistry and applications*, pp. 452–471). Boca Raton, FL: CRC Press.

ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, p. 183-198, 2001.

ANTUNES, L. E. C. Aspectos fenológicos, propagação e conservação pós-colheita de frutas de amoreira-preta (*Rubus spp*) no sul de Minas Gerais. 1999. 129 p. **Tese (Doutorado em Fitotecnia)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

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

ANTUNES, L.E.C. Potencial de produção de pequenas frutas em diferentes regiões do Sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO DO SUL DO BRASIL, 8., 2005, Caçador. **Anais...** Caçador: EPAGRI, 2005. v. 1, p. 61-63.

ANTUNES, L. E. C. Potencial de produção de pequenas frutas em diferentes regiões do Sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO DO SUL DO BRASIL, 8, 2005, Caçador. **Anais...** Caçador: EPAGRI, 2005. v. 1, p. 61-63.

ANTUNES, L. E. C.; REGINA, M. A.; DUARTE FILHO, J. **Acultura da amora-preta**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 28 p. (Boletim Técnico, 69)

ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. do C. B. **Aspectos técnicos da cultura da amora-preta**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 54 p. (Documento, 122)

ANTUNES, L.E.C. et al. Produção extemporânea de amora-preta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p.430-434, 2006.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 30 p. 1541- 1551, 1997.



BADOLATO, M. L. C. B. et al. Estudo comparativo de métodos analíticos para determinação de ácido ascórbico em sucos de frutas naturais e industrializadas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 16, p. 206-210, 1996.

BAGCHI, D. et al. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *General Pharmacology*, v. 30, p. 771-776, 1998.

BAGETTI, M. et al. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 2011. In press.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v. 239, p. 70-76, 1996.

BERSET, C.; CUVELIER, M. E. Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Sciences des Aliments*, v. 16, p. 219-245, 1996.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, v. 12, p. 123-130, 1999.

BOBBIO, G. O.; BOBBIO, P. A. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Editora Varela, 1992.

BOMSER, J. et al. *In vitro* anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Medica*, v. 62, p. 212-216, 1996.

BORS, W.; BUETTNER, G. R. The vitamin C radical and its reactions In: Packer, L. and Fuchs, J. **Vitamin C in Health and Disease**. New York, Marcel Dekker, Inc., 1997, cap. 4, p. 75-94.

BOURNE, L.C; RICE-EVANS, C.A. Detection and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. *Methods in Enzymology*, v. 299, p. 91 – 151, 1999.

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

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Review**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BROOKS; OLMO. **Register of Fruit and Nut Varieties.**, 3 ed., Alexandria: ASHS,1997. p.174-188.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzimology**, v. 52, p. 302 – 310, 1978.

CARR, A. C., FREI, B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *American Journal of Clinical and Nutrition*, v. 69, p. 1086-107, 1999.

CAVALCANTI, M. L. F. Fibras alimentares. **Revista de Nutrição PUCAMP**, v. 2, p. 88-97, 1989.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. de; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 441-449, 2007.

CERUTI, P. A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigations**, v. 21, p. 1-5, 1991.

CETEC. **Manual para fabricação de geléias.** Belo Horizonte: CETEC, 1985. Caps. 3 e 4, p. 17-30.

CHEN, Z. Y. et al. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 79, p. 157–163, 1996.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio.** Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320p.

CHUN, O. K.; KIM, D. O. Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums. **Food Research International**, v. 37, p. 337–342, 2004.

CLIFFORD, M. N. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1063–1072, 2000.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes.** Ed. Manole Ltda, 2009. 1172 p.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmico**, v. 5, p. 33 – 40, 2004.

DAI, J. et al. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 837 – 847, 2009.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (1993). 1. Plant phenolics methods in plant biochemistry (2nd printing). London: Academic Press Limited. pp. 326–341.

DEIGHTON, N. et al. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1307-1313, 2000.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH<sup>1</sup>. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.

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

ESTERBAUER et al. Detection of malonaldehyde high performance liquid chromatography. **Methods Enzimology**, v. 105, p. 319-328, 1984.

FACCHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; SANTOS, A. M. dos. Amoreira-preta, framboesa e mirtilo: pequenos frutos para o sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13, 1994, Salvador. **Resumos...** Salvador : Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1994. v. 3, p. 989-990.

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

FENG, R. et al. Blackberry extracts inhibit activating protein 1 activation and cell transformation by perturbing the mitogenic signaling pathway. **Nutrition and Cancer**, v. 50, p. 80–89, 2004.

FERREIRA, D. S.; ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, no. ahead, p.0-0, 2010.

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

FRANCO, G. Nutrição: texto básico e tabela de composição química dos alimentos. 6. ed. Rio de Janeiro : Ateneu, 1992.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problem of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1925-1941, 2000.

FRANKEL, E. N. et al. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1054-1059, 1994.

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

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

GENOVESE, M. I. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology**, v. 14, p. 207-214, 2008.

GRANADA, G. L.; VENDRUSCOLO, J. L.; TREPTOW, R. O. Caracterização química e sensorial de sucos clarificados de amora-preta (*Rubus* spp. L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, p. 143-147, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HALVORSEN, B. L. et al. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 95–135, 2006.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HASSIMOTTO, N. M. A. et al. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 28, p. 702–708, 2008.

HEINONEN, I. M.; MEYER, A. S.; FRANKEL, E. N. Antioxidant activity of Berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, p. 4107, 1998.

HERMANN, K. M.; WEAVER, L. M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 473 – 503, 1999.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. I. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1881-1856, 2005.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2489 - 2491, 1987.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G.A.F.; HOUGHTON, J.D. **Natural food colorants**. New York-USA: AVI, 1992.

KAMEI, H. et al. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. **Cancer Investigation**, v. 13, p. 590-594, 1995.

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

KAPPUS, H. Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. In: **Sies H, editor. Oxidative stress**. London: Academic Press, 1985. p. 273-310.

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

KONG, J. M. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, p. 923–933, 2003.

KRIS-ETHERTON et al. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p. 1009-1015, 1999.

KUSKOSKI, M.; ASUERO, A.; TRONCOSO, A. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 726–732, 2005.

- LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 4, p. 969-978, 1988.
- LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, v. 20, p. 207-220, 2000.
- LEVINE, M. et al. 1995. Determination of optimal vitamin C requirements in humans. *American Journal of Clinical and Nutrition*, v. 62, p. 1347-1356, 1995.
- LI, H. et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines **Food Chemistry**, v. 112, p. 454-460, 2009.
- LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 517S-520S, 2003.
- LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M. E SARTORI, S.: Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura). Instituto Plantarum, 2006.
- MAAS, J. L.; GALLETTA, G. J.; STONER, G. D. Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberry: a review. **HortScience**, Alexandria, v. 26, p. 10-14. 1991.
- MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies 1-3. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 230S-242S, 2005.
- MARKAKIS, P. Anthocyanins as Food Color. Academic Press: New York, 1982.
- MATSUMOTO, H. et al. Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3560-3563, 2003.
- MENSINK et al. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1146-1155, 2003.
- MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 91, 1971.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakar in **Journal of Science and Technology**, v. 26, 2004.

MOORE, J. N. Blackberry breeding. **HortScience**, v.19, p.183-185. 1984.

MOURE et al. Evaluation of extracts from Gevuina avelana Hulls as antioxidants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3890–3897, 2000.

MORENO-ALVAREZ, M. J. et al. Estabilidade de antocianinas em jugos pasteurizados de mora (*Rubus glaucus* Benth). **ALAN**, v. 52, supl. 2, 2002, online.

MOYER, R. A. et al. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 519-525, 2002.

NARAYANA, K. R., et al. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 2 - 16, 2001.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523–1542, 2006.

PANTELIDIS, G. E. et al. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, gooseberries and Cornelian cherries. **Food Chemistry**, v. 102, p. 777–783, 2007.

PAPAS, A. M. Diet and antioxidant status. *Food Chemistry and Toxicology*, v. 37, p. 999-1007, 1999.

PAWLOSKY, R. J., WARD, G., e SALEM, N. Essential fatty acid uptake and metabolism in the developing rodent brain. **Lipids**, n. 31(suppl), S103–S107, 1996.

POLING, E. B. Blackberries. **Journal of Small Fruit and Viticulture**, v. 14, p. 38-69, 1996.

PRIOR, R. L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 1173-1181, 1999.

PRIOR, R. L. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3273-3279, 2003.

PROSKY, L. What is a dietary fiber? New look at the definition. In: MCCLEARY, B. V. e PROSKY, L. **Advanced dietary fibre technology**. Londres, Blackwell Science, 2001. p.63-76.

RAHMAN, I.; ADCOCK; I. M. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. **European Respiratory Journal**, v. 28, p. 214–219, 2006.

RASEIRA, M. do C. B.; SANTOS, A.M. dos; MADAIL, J. C. M. **Amora preta: cultivo e utilização**. Pelotas : EMBRAPA. CNPFT, 1984. 20p. (Circular Técnica, 11).

RECORD, I. R.; DREOSTI, I. E.; McINERNEY, J. K. Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruits and vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture. **British Journal of Nutrition**, v. 85, p. 4459–4464, 2001.

REIN, M.. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Helsinki: University of Helsinki. pp. 10–14., 2005.

RENAUD, S.; LORGERIL, M. D. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v. 339, p. 1523–1526, 1992.

REYNERSTON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, p. 883-890, 2008.

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

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

RUXTON, C.; GARDNER, E.; WALKER, D. Can pure fruit and vegetable juices protect against cancer and cardiovascular disease too? A review of the evidence. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 57, p. 249–272, 2006.



SAKAGAMI, H. et al. Apoptosis inducing activity of vitamin C and vitamin K. **Cell and Molecular Biology**, v. 46, p. 129, 2000.

SANTOS, A. M. dos; RASEIRA, M. do C. B. **Lançamento de cultivares de amoreira-preta**. Pelotas : EMBRAPA – CNPFT, 1988. n.p. (EMBRAPA: Informativo 23).

SANTOS, A. M.; RASEIRA, M. C. B.; MADAIL, J. C. M. *Amora-preta*. 2.ed. Brasília: Embrapa-SPI; Pelotas: Embrapa-CPACT, 1997. 61p. (Coleção Plantar, 33).

SAURA-CALIXTO, F.; GOÑI, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chemistry**, v. 94, p. 442-447, 2006.

SAUTEBIN, L. et al. Effect of anthocyanins contained in a blackberry extract on the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. **Planta Medica**, v. 70, p. 745–752, 2004.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 30, p. 1191, 2001.

SEERAM, N. P., NAIR, M. G. Inhibition of lipid peroxidation and structureactivity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5308–5312, 2002.

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

SEERAM, N. P. et al. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9329-9339, 2006.

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

SMET et al. Lipid and protein oxidation of broiler meat as influenced by dietary natural antioxidant supplementation. **Poultry Science**, v. 87, p. 1682–1688, 2008.

SERRAINO, I. et al. Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. **Life Science**, v. 73, p. 1097–1114, 2003.

SIES, H. **Oxidative stress**. London: Academic, 1985. 507 p.

SIMOPOULOS, A. P., SALEM, N. Fatty acids and lipids from cell biology to human disease. **Lipids**, n. 31(suppl), S1, 1996.

SOUZA FILHO, M. S. M et al. Efeito do branqueamento, processo osmótico, tratamento térmico e armazenamento na estabilidade da vitamina C de pedúnculos de caju processados por métodos combinados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, p. 211-213, 1999.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas próbióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, 2005.

TOSUN, I.; USTUN, N. S.; TEKGULER, B. Physical and chemical changes during ripening of blackberry fruits. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 87-90, 2008.

TRABER, M. G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. **Mineral and Electrolyte Metabolism**, v. 23, p. 135-139, 1997.

VASCONCELOS, S. M. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323, 2007.

VIZZOTO, M. **Amora-preta: uma fruta antioxidante**. Artigo de Divulgação na Mídia Embrapa Clima Temperado, 2008.

VON GADOV, A., JOUBERT, E., HANSMANN. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT, and BHA. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 632–638, 1997.

WANG, S.Y. et al. Ellagic acid content in small fruits mayhaws, and other plants. **Journal Small Fruit and Viticulture**, v.2, p.11-49, 1994.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 140-146, 2000.

WANG, J.; MAZZA, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4183-4189, 2002.

WINTON, A. L., WINTON, K.B. **Análise de alimentos**. Barcelona: Hispano Americano, 1958. 1205 p.

WU, X. et al. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4026 – 4037, 2004.

YOKOZAWA, T. et al. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Biochemistry Pharmacology**., v. 56, p. 213-222, 1998.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 502 - 509, 2003.

**APÊNDICE A -Fotografias de algumas variedades de amoras-pretas utilizadas no experimento:** Seleção 02/96 (acima à esquerda), cultivar Tupy (acima à direita), cultivar Cherokee (abaixo à esquerda) e cultivar Guarani (abaixo à direita).

