



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

ELISEU RODRIGUES

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E PERFIL FENÓLICO DE CULTIVARES DE  
MIRTILO (*Vaccinium* sp.) PRODUZIDAS NO BRASIL

Florianópolis

2009

ELISEU RODRIGUES

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E PERFIL FENÓLICO DE CULTIVARES DE  
MIRTILO (*Vaccinium* sp.) PRODUZIDAS NO BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
do Centro de Ciências Agrárias,  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito final para a obtenção do  
título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Roseane Fett

Florianópolis

2009

*Dedico esta dissertação:  
Aos meus pais, Maria e Nelsom;  
ao meu irmão, Elias;  
à minha noiva, Naira.*

## **AGRADECIMENTOS**

Foram muitos os que, direta ou indiretamente, me ajudaram a concluir este trabalho. Meus sinceros agradecimentos...

À minha família, mãe Maria, pai Nelsom e irmão Elias, que sempre acreditaram na minha capacidade.

À minha noiva Naira Poerner, pelo apoio incondicional, o grande carinho e compreensão durante este período que ficamos distantes.

À professora Dra. Roseane Fett, pela oportunidade e pela grande confiança atribuída.

Ao meu grande colega e amigo Ismael, primeiramente por ter dado grande apoio durante a etapa de seleção, e também pela amizade e parceria nos trabalhos desenvolvidos durante o período de realização do Mestrado.

Ao meu colega e amigo Luciano Gonzaga por compartilhar seu conhecimento e inteligência.

Às colegas Cristiane Copetti e Graciele da Silva Campelo Borges pela amizade e pela grande ajuda nas atividades de laboratório.

Ao responsável técnico do Laboratório de análises de Vinhos do MAPA e amigo Paulo Gustavo Celso, pela oportunidade de realizar as análises cromatográficas.

À Capes pela bolsa de Mestrado e ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade.

*“O pensamento lógico pode levar você de A a B, mas a imaginação te leva a qualquer lugar do universo.”*

(Albert Einstein)

RODRIGUES, E. **Atividade antioxidante *in vitro* e perfil fenólico de cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil** 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, [2009].

## RESUMO

Neste trabalho foram avaliados a atividade antioxidante, os compostos fenólicos totais, as antocianinas monoméricas totais e o perfil fenólico (ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos) das principais cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil. Foram coletadas amostras representativas das espécies *Vaccinium corymbosum* e *Vaccinium ashei* Reade, totalizando 10 cultivares. O método Folin-Ciocalteu foi aplicado para quantificar os compostos fenólicos totais e os métodos ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), FRAP (Poder de redução do Ferro) e  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico foram aplicados para avaliar a atividade antioxidante. A identificação e quantificação dos principais ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O teor de compostos fenólicos encontrado variou de 274,48 até 694,60 mg de equivalente a ácido gálico (EAG).100 g<sup>-1</sup> em peso fresco (PF). As cultivares Clímax (*Vaccinium ashei* Reade) e Bluecrop (*Vaccinium corymbosum*) apresentaram a maior e a menor concentração de compostos fenólicos totais, respectivamente. A concentração de antocianinas monoméricas totais variou da cultivar Bluecrop até a Tifblue, com valores de, respectivamente, 40,62 e 378,31 mg.100 g<sup>-1</sup> PF. A atividade antioxidante medida pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP mostrou grande amplitude entre as cultivares estudadas, com variação de, respectivamente, 1238,48 a 2445,96, 1014,24 a 2055,06 e 699,780 a 1740,25  $\mu$ mol TEAC.100 g<sup>-1</sup> PF. As cultivares representativas da espécie *Vaccinium ashei* Reade apresentaram, em geral, uma maior concentração de compostos fenólicos, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante que a cultivar Bluecrop, única representante da espécie *Vaccinium corymbosum* avaliada. Foi encontrada uma correlação moderada ( $p < 0,05$ ) entre a atividade antioxidante e a concentração de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais. Os ácidos protocatecuico e clorogênico foram encontrados como compostos fenólicos majoritários, em concentrações variando de, respectivamente, 39,62 a 110,86 e 18,18 a 33,16 mg.100 g<sup>-1</sup> PF. Em geral, as cultivares de mirtilo produzidas no Brasil apresentam o mesmo perfil qualitativo de ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos, porém apresentam diferentes concentrações destes compostos em sua composição. Este trabalho demonstra que existe uma diversidade de níveis de concentrações de compostos fenólicos e atividade antioxidante no mirtilo produzido no Brasil, de acordo com a cultivar e o local de produção. Além disso, confirma o potencial desta fruta como fonte de compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante.

**Palavras chave.** Mirtilo, cultivares, compostos fenólicos, atividade antioxidante.

RODRIGUES, E. **Antioxidant activity *in vitro* and phenolic profile of cultivars of blueberry (*Vaccinium* sp.) grown in Brazil** 85 p. Dissertation (Master Degree in Food Science) – Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, [2009].

## **ABSTRACT**

In this work the antioxidant activity, total phenolic compounds concentration, total monomeric anthocyanins and phenolic profile (phenolic acids and non-anthocyanic flavonoids) of the main cultivars of blueberry (*Vaccinium* sp.) grown in Brazil were evaluated. Samples representatives of the species *Vaccinium corymbosum* and *Vaccinium ashei* Reade were provided by the main producers of blueberry, totaling 10 cultivars evaluated. Folin-Ciocalteu method was applied to quantify the total phenolic compounds and methods ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin)-6-sulfonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (ferric reducing antioxidant power) and  $\beta$ -carotene/linoleic acid were applied to evaluate the antioxidant activity. The identification and quantification of phenolic acids and non-anthocyanic flavonoids was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The phenolic compounds content ranged from 274.48 to 694.60 mg gallic acid equivalent (GAE).100 g<sup>-1</sup> fresh weight (FW). Clímax (*Vaccinium ashei* Reade) and Bluecrop (*Vaccinium corymbosum*) cultivars presented the highest and lowest concentration of total phenolic compounds, respectively. The concentration of monomeric anthocyanins ranged from cultivar Bluecrop to Tifblue, with values of, respectively, 40.62 and 378.31 mg.100 g<sup>-1</sup> FW. The antioxidant activity as measured by methods ABTS, DPPH and FRAP showed great variation among cultivars, ranging, respectively, from 1238.48 to 2445.96, 1014.24 to 2055.06 and 699.780 to 1740.25  $\mu$ mol TEAC.100 g<sup>-1</sup> FW. Cultivars representatives of the species *Vaccinium ashei* Reade presented, in general, a greater concentration of phenolic compounds, monomeric anthocyanins and antioxidant activity than the cultivar Bluecrop, only representative of the specie *Vaccinium corymbosum* evaluated. There was a moderate correlation between antioxidant activity measured and concentration of anthocyanins and phenolic compounds. Protocatechuic and chlorogenic acids were found as major phenolic compounds in concentrations ranging from, respectively, 39.62 to 110.86 and 18.18 to 33.16 mg.100 g<sup>-1</sup> FW. In general, blueberry cultivars grown in Brazil present similar of phenolic acids and non-anthocyanic flavonoids qualitative profile, presenting, however, different concentration of these compounds in their composition. This work demonstrates the diversity of levels of phenols concentration and antioxidant activity of the blueberry grown in Brazil according to the cultivar and location production. In addition, confirms the potential of this fruit as a source of phenolic compounds with high antioxidant activity.

**Keywords.** Blueberry, cultivars, phenolic compounds, antioxidant activity.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Produção de fenilpropanóides, estilbenos, lignanas, ligninas, suberinas, cutinas, flavonóides e proantocianidinas..... 13
- Figura 2.** Exemplos de ácidos benzóicos (a) e cinâmicos (b). ..... 15
- Figura 3.** Estrutura básica dos flavonóides. .... 16
- Figura 4.** Exemplo de estrutura química de um tanino hidrolizável ( $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glicose). .... 16
- Figura 5.** Estrutura química geral de um tanino condensado sofrendo catálise ácida e originando seus produtos de degradação. .... 17
- Figura 6.** Principais antocianidinas encontradas na natureza..... 19
- Figura 7.** Representação esquemática dos métodos competitivos (a) e não-competitivos (b). ..... 23
- Figura 8.** Radical ABTS<sup>•+</sup>. ..... 24
- Figura 9.** Estrutura química do radical DPPH<sup>•</sup>. ..... 25
- Figura 10.** Reação de redução do complexo férrico  $[(Fe^{+3} - (TPTZ)_2]^{+3}$  para um complexo ferroso  $[(Fe^{+2} - (TPTZ)_2]^{+2}$  ..... 26
- Figura 11.** Mirtilo (*Vaccinium* sp.). ..... 27

### CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Relação entre a concentração de compostos fenólicos e antocianinas e a atividade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP) em cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil ..... 59
- Figura 2.** Capacidade de inibir a oxidação (%) de extratos de cultivares de mirtilo produzidas no Brasil (*Vaccinium* sp.).. ..... 62

### CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Cromatograma dos ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos da cv. Powderblue nos quatro comprimentos de onda (260, 280, 320 e 360 nm) usados para identificação e quantificação. .... 75

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Principais métodos <i>in vitro</i> para determinação da atividade antioxidante e seus princípios de ação.....	22
--	----

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1.</b> Compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas e relação antocianinas monoméricas/fenólicos totais de cultivares mirtilo ( <i>Vaccinium</i> sp.) produzidas no Brasil.....	55
---	----

<b>Tabela 2.</b> Atividade Antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP) de cultivares de mirtilo ( <i>Vaccinium</i> sp.) produzidas no Brasil. ....	60
---	----

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1.</b> Programa do gradiente de eluição. ....	74
---	----

<b>Tabela 2.</b> Teores de ácido fenólicos em cultivares de mirtilo ( <i>Vaccinium</i> sp.) produzidas no Brasil.....	76
---	----

<b>Tabela 3.</b> Teores de flavonóides não-antociânicos em cultivares de mirtilo ( <i>Vaccinium</i> sp.) produzidas no Brasil. ....	77
---	----

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>12</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
1 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	13
1.1 ANTOCIANINAS .....	17
2 ANTIOXIDANTES.....	19
3 MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	21
3.1 Método ABTS.....	23
3.2 Método DPPH'.....	24
3.3 Método FRAP .....	25
3.4 Método da co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico .....	26
4 MIRTILO ( <i>Vaccinium</i> sp.) .....	26
4.1 Características botânicas e produção .....	26
4.2 Composição fenólica.....	29
4.3 Fatores que afetam o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante .....	31
4.4 Propriedades funcionais .....	33
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>46</b>
COMPOSTOS FENÓLICOS, ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DE CULTIVARES DE MIRTILO ( <i>Vaccinium</i> sp.) PRODUZIDAS NO BRASIL.....	47
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>68</b>
ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES NÃO-ANTOCIÂNICOS EM CULTIVARES DE MIRTILO ( <i>Vaccinium</i> sp.) PRODUZIDAS NO BRASIL.....	68

## INTRODUÇÃO

A associação entre uma dieta rica em frutas e vegetais e a diminuição do risco de doenças cardiovasculares, de certos tipos de câncer e aquelas relacionadas ao envelhecimento é demonstrada por consideráveis evidências epidemiológicas o que, por hipótese, é devido ao conteúdo de antioxidantes (GOODWIN e BRODWICK, 1995; YANG et al., 2001; KAUR e KAPOOR, 2001; GARCÍA-ALONSO et al., 2004; VECCHIA, 2004; DAI et al. 2006; NÖ THLINGS et al., 2008; TRICHOPOULOU et al., 2008). A ação destes compostos está relacionada à atenuação de eventos oxidativos e inibição ou ativação de sistemas enzimáticos que podem contribuir para o surgimento dessas doenças (HALLIWELL et al., 1995; PIETTA, 2000; SEERAM e NAIR, 2002).

Dentre os compostos com propriedades antioxidantes destacam-se os compostos fenólicos, presentes nas formas livres ou complexadas. Entre as principais fontes destes compostos estão as pequenas frutas como amora, cereja, uva, ameixa, framboesa, morango e mirtilo (PRIOR et al., 1998; MOYER et al., 2002; WU et al., 2004). O mirtilo (*Vaccinium* sp.) destaca-se pela elevada concentração de compostos fenólicos, os quais compreendem ácidos fenólicos e flavonóides (KADER et al., 1996; KALT et al., 1999; SELLAPPAN, AKOH e KREWER, 2002; ZHENG e WANG, 2003). Dentre os flavonóides, destaca-se a alta concentração de antocianinas presente, caracterizando esta fruta como uma matéria-prima para produção de corante natural (CAMIRE et al., 2002; LEE e WROLSTAD, 2004).

Vários trabalhos demonstraram que há uma grande variabilidade qualitativa e quantitativa dos fenólicos encontrados no mirtilo. Esta diferença na composição fenólica é dependente de fatores intrínsecos (gênero, espécie e cultivar) e extrínsecos (condições ambientais e de cultivo, manejo e condições de armazenamento) (CONNOR et al., 2002; TARUSCIO et al., 2004; WANG et al., 2008; GIOVANELLI e BURATTI, 2009). Além disso, fatores como a complexidade desse grupo de compostos, métodos de extração e quantificação também podem afetar a composição deste grupo de compostos.

A produção de mirtilo (*Vaccinium* sp.) no Brasil é ainda recente e pouco conhecida, localizada majoritariamente na região Sul e Sudeste do país (SANTOS, 2004). A maior parte da produção é destinada ao mercado externo e a pequenos mercados finos do país. A literatura destaca pesquisas sobre a composição fenólica e a atividade antioxidante do mirtilo produzido em diversos países, porém é quase inexistente pesquisas sobre o mirtilo cultivado no Brasil. Considerando esta situação e o fato da composição fenólica do mirtilo ser afetada por diversos fatores relacionados à região de produção, o presente trabalho teve por objetivo determinar a concentração fenólica total, as antocianinas monoméricas totais, a atividade antioxidante *in vitro* e os ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos das principais cultivares de mirtilo produzidas no Brasil.

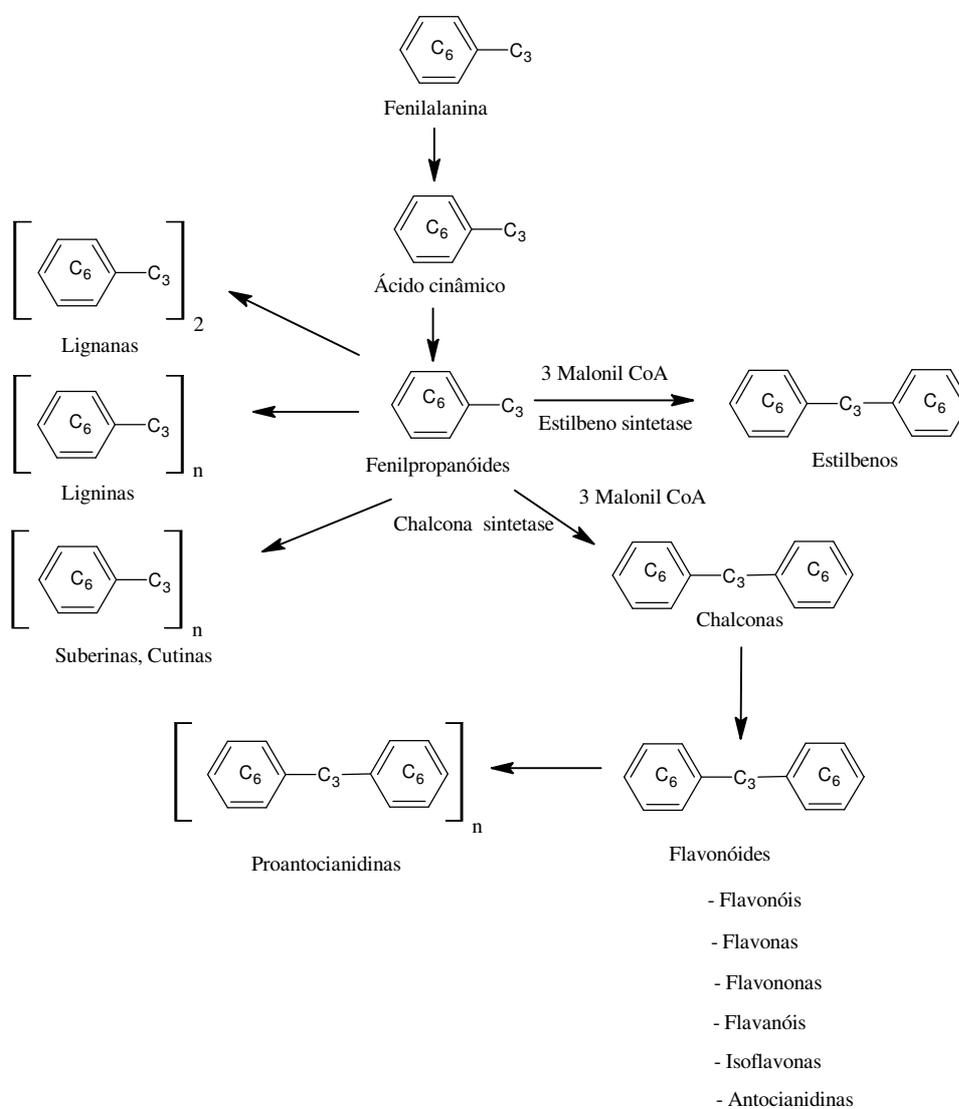
## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados por plantas durante o desenvolvimento normal, e em resposta a condições de estresse tais como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta (UV), entre outras. Estes compostos estão presentes em todas as plantas, constituindo um grupo diversificado de fitoquímicos derivados da fenilalanina e tirosina (Figura 1) (BECKMAN, 2000; NACZK e SHAHIDI, 2006).



**Figura 1.** Produção de fenilpropanóides, estilbenos, lignanas, ligninas, suberinas, cutinas, flavonóides e proantocianidinas. Fonte: Naczk e Shahidi (2004).

As plantas contêm fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos, lignanas e ligninas. Estes compostos fenólicos podem atuar atraindo polinizadores, contribuindo na pigmentação, como antioxidantes, e como agentes protetores contra luz UV, patógenos, predadores, entre outras funções (BRAVO, 1998; NACZK e SHAHIDI, 2006). Em alimentos, os fenólicos podem contribuir para o amargor, adstringência, cor, *flavor*, odor e estabilidade oxidativa de produtos. Além disso, a capacidade de proteção à saúde e propriedades antinutricionais de outros fenólicos são de grande importância para produtores, processadores e consumidores (ÂNGELO e JORGE, 2007).

A distribuição dos compostos fenólicos nos tecidos das plantas não é uniforme. Compostos fenólicos insolúveis são encontrados nas paredes celulares, enquanto fenólicos solúveis são encontrados no interior dos vacúolos. As camadas mais externas das plantas contêm níveis superiores de compostos fenólicos do que aquelas localizadas nas camadas mais internas. Compostos fenólicos da parede celular, ligados a vários componentes celulares, contribuem para a resistência mecânica da parede celular e exibem papel na regulação do crescimento e morfogênese da planta. Também estão ligados à resposta da célula a condições de estresse e patógenos. Os ácidos ferúlico e p-cumárico são os principais ácidos fenólicos presentes na parede celular. Estes compostos podem estar esterificados com pectina ou arabinoxilanas ou possuir ligações cruzadas com polissacarídeos da parede celular na forma de dímeros (NACZK e SHAHIDI, 2006).

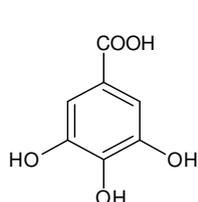
Os compostos fenólicos exibem uma variedade de propriedades fisiológicas, tais como antialergênica, antiarterogênica, antiinflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, antioxidante e efeito cardioprotetor e vasodilatador (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; PUUPPONEM-PIMIÄ et al., 2001). Todas estas propriedades justificam o grande número de estudos desenvolvidos para o monitoramento destes compostos em frutas e vegetais.

Os principais compostos fenólicos da dieta humana são os ácidos fenólicos, flavonóides e taninos, os quais ocorrem nos alimentos em quantidades

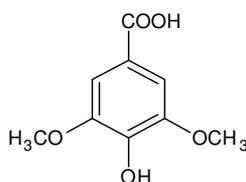
aproximadas de 1 – 3 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento. A avaliação da ingestão desses compostos é dificultada pelo grande número de tipos de fenólicos e por diversos fatores que afetam seu conteúdo, como: espécie e cultivar, sistema de cultivo, localização geográfica, estado de maturação, partes avaliadas e condições de armazenamento (KING e YOUNG, 1999).

Os ácidos fenólicos (Figura 2) caracterizam-se por possuírem um anel benzênico, um grupamento carboxílico, e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula (NATELLA et al., 1999). São divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). O terceiro são as cumarinas, derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (SOARES, 2002).

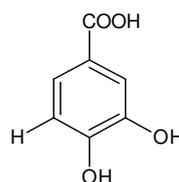
a)



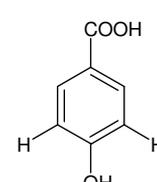
Ácido gálico



Ácido siríngeo

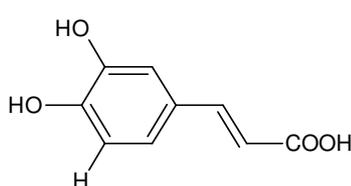


Ácido protocatecuico

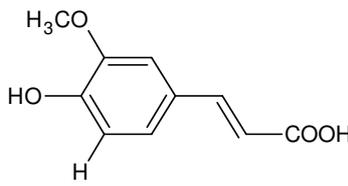


Ácido p-hidroxibenzóico

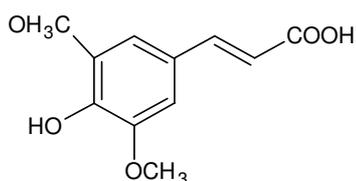
b)



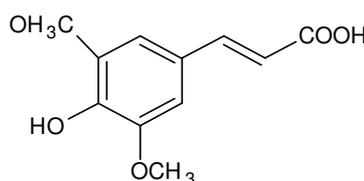
Ácido p-cumárico



Ácido caféico



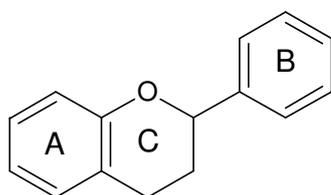
Ácido ferúlico



Ácido sinápico

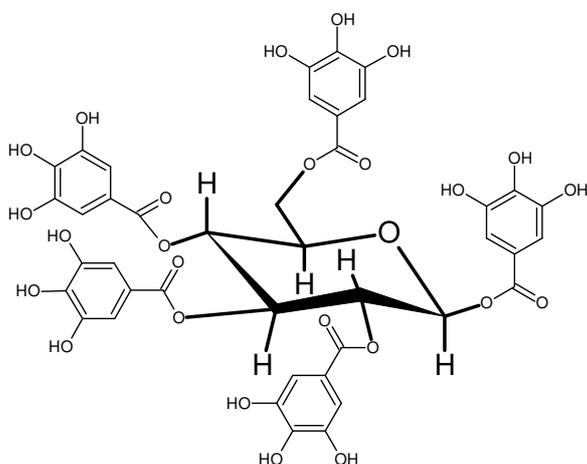
**Figura 2.** Exemplos de ácidos benzóicos (a) e cinâmicos (b). Fonte: Balasundram, Sundram e Samman (2006).

Os flavonóides constituem um grupo enorme de fenólicos de plantas, representando mais da metade dos compostos fenólicos que ocorrem naturalmente (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006). Caracterizam-se estruturalmente por um esqueleto carbônico C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Figura 3), no qual os três carbonos entre os grupos fenil são ciclizados com oxigênio. As várias classes de flavonóides diferem no nível de oxidação e no padrão de substituição no anel C, enquanto compostos individuais dentro de uma classe diferem no padrão de substituição nos anéis A e B (PIETTA, 2000). Assim, dividem-se em seis classes: flavanonas, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavanóis e antocianidinas (HOLLMAN e KATAN, 1999).



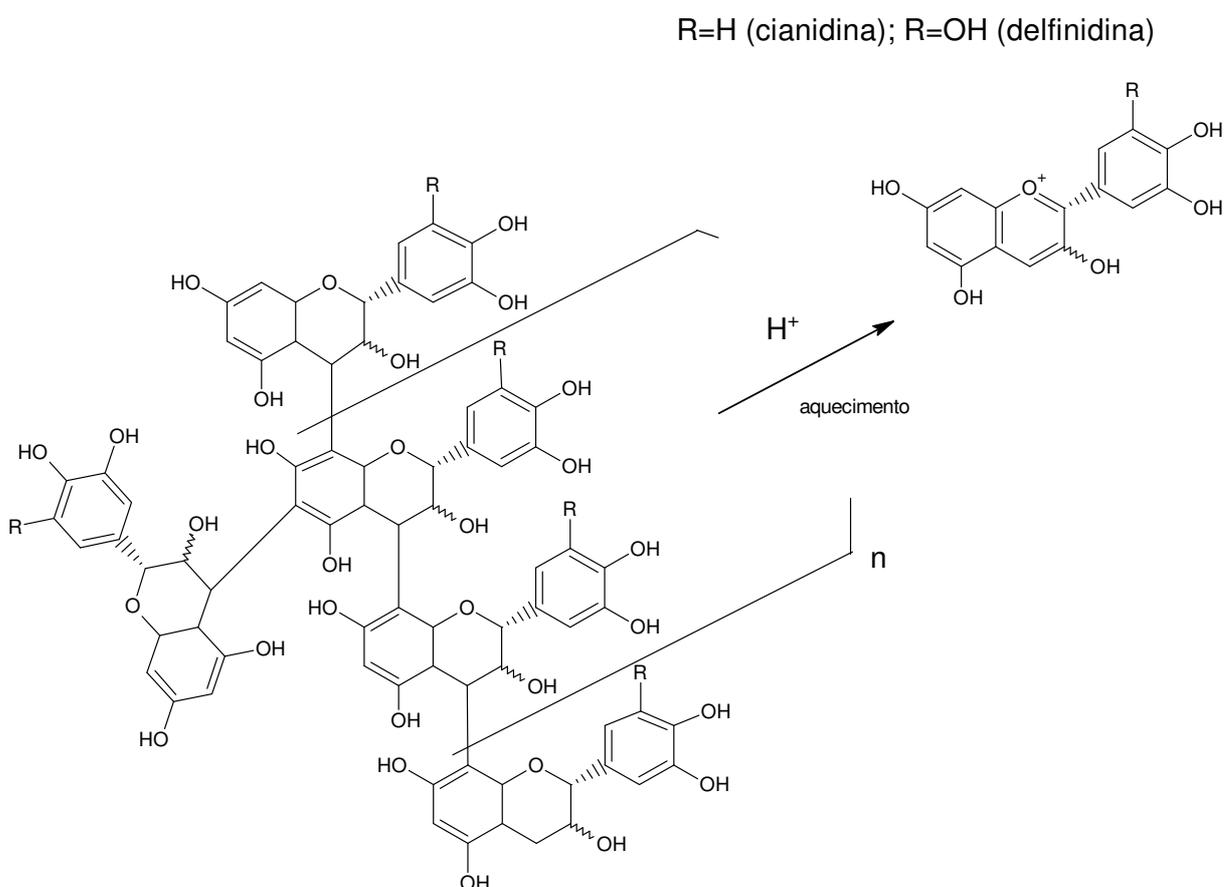
**Figura 3.** Estrutura básica dos flavonóides. Fonte: Cook e Samman (1996).

Os taninos são compostos de elevada massa molecular e conferem a sensação de adstringência a muitas frutas e vegetais. Considerando sua estrutura, os taninos podem ser classificados em hidrolisáveis e condensados. Os primeiros contêm um núcleo central de glicose ou um álcool polídrico, esterificado com ácido gálico, sendo subdivididos em galotaninos e elagitaninos (Figura 4). São facilmente hidrolisáveis com ácidos, bases ou enzimas (MELLO e SANTOS, 2007).



**Figura 4.** Exemplo de estrutura química de um tanino hidrolizável ( $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloi-D-glicose. Fonte: Mello e Santos (2007).

Os taninos condensados são polímeros de catequina e/ou leucoantocianidina, não sendo hidrolisáveis com facilidade por tratamento ácido (SOARES, 2002). Estas moléculas são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Essa classe de taninos também é denominada de proantocianidina devido ao fato de os taninos condensados produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, tais como a cianidina e delphinidina, após degradação com ácido mineral a quente (Figura 5) (MELLO e SANTOS, 2007).



**Figura 5.** Estrutura química geral de um tanino condensado sofrendo catálise ácida e originando seus produtos de degradação. Fonte: Mello e Santos (2007).

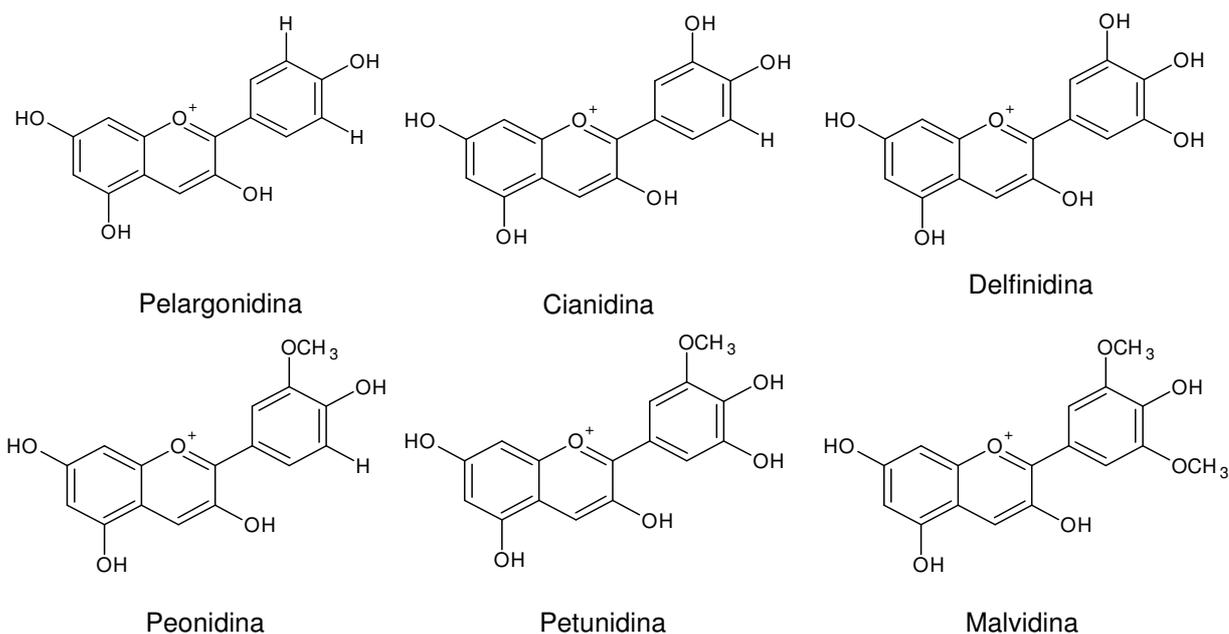
### 1.1 Antocianinas

Antocianinas são os principais pigmentos de plantas vasculares (CASTAÑEDA-OVANDO, 2009). São responsáveis pela cor vermelha, azul e púrpura de flores, frutas, folhas e órgãos de armazenamento (ISHIKURA, 1975; ISHIKURA e SUGAHARA, 1979; BRIDLE e TIMBERLAKE, 1997). Estruturalmente

são consideradas flavonóides porque possuem em sua estrutura o esqueleto carbônico C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> característico e a mesma origem biossintética de outros flavonóides (FEILD, LEE e HOLBROOK, 2001). Porém, diferem de outros flavonóides naturais pela grande absorção de radiação eletromagnética na região visível do espectro, e conseqüentemente apresentam-se com cores variadas (JACKMAN e SMITH, 1992). A cor apresentada por estas moléculas foi primeiramente explicada por Pauling em 1939, que propôs que a estrutura ressonante do íon flavílium era responsável pela intensidade da sua cor (WROLSTAD, DURST e LEE, 2005). As moléculas de antocianinas consistem de duas ou três partes: a base aglicona (antocianidina), um açúcar e, freqüentemente, ácidos ligados ao açúcar (FRANCIS, 1989).

As antocianinas são derivados glicosilados de 17 diferentes antocianidinas, as quais são polihidroxi e/ou polimetoxi dos sais do 2-fenilbenzopirílium (flavílium). Em muitos casos os resíduos de açúcares são acilados por ácido p-cumárico, caféico, ferúlico, e algumas vezes pelos ácidos p-hidroxibenzóico, malônico ou acético (FRANCIS, 1989). Estes substituintes são usualmente ligados na posição 3 dos açúcares, eventualmente na posição 6 e, menos freqüentemente, na posição 4 dos mesmos. Quanto à natureza, os açúcares são principalmente os monossacarídeos glicose, galactose, ramnose e arabinose. Di e trissacarídeos formados pela combinação destes também podem ocorrer. A posição C-3 da antocianidina sempre é ocupada por um açúcar, sendo que outro açúcar presente ocupa geralmente a posição C-5. Contudo, glicosilação na posição C-7, C-3' e C-5' já foi demonstrada (BROUILLARD, 1982).

Das 17 antocianidinas presentes na natureza, apenas 6 (Figura 6) são constituintes comuns das antocianinas, sendo elas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ e PAREDES-LÓPEZ, 2000). Um grande número de antocianinas é derivado das diferentes combinações possíveis entre antocianidinas, açúcares e ácidos orgânicos, sendo conhecidas mais de 600 antocianinas (KONCZAK e ZHANG, 2004).



**Figura 6.** Principais antocianidinas encontradas na natureza. Fonte: Brouillard (1982).

## 2 ANTIOXIDANTES

A respiração é um fenômeno intimamente relacionado à vida. Entretanto, produz as chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres. O termo radical livre é freqüentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nos orbitais mais externos, o que torna estas moléculas altamente reativas, capazes de reagir com qualquer composto que esteja próximo, passando a assumir uma ação oxidante (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1999).

Assim, a formação de ERO e radicais livres ocorre no metabolismo normal, existindo a necessidade permanente de inativar estas moléculas de alta reatividade. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resulta no chamado estresse oxidativo (DÁVALOS, GOMEZ-CORDOVÉS e BARTOLOMÉ, 2003). Os danos induzidos por estas moléculas podem afetar muitas moléculas biológicas, incluindo os lipídeos, as proteínas, os carboidratos e o DNA. Conseqüentemente, as ERO estão implicadas em várias doenças degenerativas humanas, como doenças cardiovasculares, disfunções cognitivas e câncer (PIETTA, 2000).

Para combater os radicais livres e/ou as chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) o corpo é equipado com um sistema de defesa efetivo (antioxidantes endógenos), o qual inclui várias enzimas e moléculas antioxidantes de alto e baixo peso molecular (KAUR e KAPOOR, 2001). Esta proteção pode ser baseada em vários mecanismos de ação, principalmente: inibição da geração e a capacidade de neutralizar ERO/ERN, capacidade redutora, capacidade de quelar metais, atividade como enzima antioxidante e inibição de enzimas oxidativas (MAGALHÃES et al., 2008). Além destes antioxidantes endógenos, há aqueles consumidos na dieta (antioxidantes exógenos), que incluem o ácido ascórbico (vitamina C), a vitamina E, a vitamina A, os carotenóides e os compostos fenólicos.

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, em baixa concentração em relação a um determinado substrato, retarda ou previne a oxidação do substrato oxidável (HALLIWEL, 1995). Quando o mecanismo de ação for através de sua reação com o radical livre, o novo radical formado deve ser estável e incapaz de propagar a reação (SHAHIDI et al., 1992).

Os antioxidantes, baseado no mecanismo de ação, podem ser classificados em primários, no qual atuam como doadores de prótons e/ou elétrons, impedindo o processo de iniciação desencadeado pelos radicais livres. Nesta classe de antioxidantes encontram-se os compostos fenólicos, o tocoferol, os carotenóides e os antioxidantes sintéticos. São classificados como secundários, quando atuam no bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos e convertendo-os na forma inativa por ação de agentes redutores, bloqueando a reação em cadeia através da captação de intermediários reativos, como os radicais peroxila e alcooxila. Nesta classe estão os antioxidantes sintéticos, as vitaminas A, C e E, e também os compostos fenólicos (DONELLI e ROBINSON, 1995; PIETTA, 2000).

Entre os antioxidantes presentes nas frutas e vegetais, os mais ativos e freqüentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os ácidos fenólicos e flavonóides (RICE-EVANS, 2001; SOARES, 2002). A capacidade antioxidante destes compostos é devido à sua habilidade de seqüestrar radicais

livres, pela doação de hidrogênio ou elétrons, ou pela quelação de íons metálicos (AMAROWICZ et al., 2004). A estrutura destes compostos é determinante na sua atividade neutralizadora de radicais e de quelação de metais.

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos depende do número e posição de grupos hidroxila em relação ao grupo funcional carboxila. Ácidos monohidroxibenzóicos com o grupo OH ligado nas posições *orto* ou *para* em relação ao grupo COOH não apresentam atividade antioxidante, porém, isso não acontece para o ácido *m*-hidroxibenzóico. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos aumenta com o aumento do grau de hidroxilação, como é o caso do trihidroxilado ácido gálico, que apresenta alta atividade antioxidante. Em contrapartida, a substituição dos grupos hidroxila nas posições 3 e 5 por grupos metoxila, como no caso do ácido siríngeo, reduz a atividade. Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam maior atividade antioxidante que os ácidos hidroxibenzóicos correspondentes. Isso pode ser devido ao grupo CH=CH-COOH, que garante maior habilidade de doar íons H<sup>+</sup> e estabilizar radicais que o grupo COOH (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006; ANGELO e JORGE, 2007).

A relação da estrutura da molécula flavonóide e sua atividade antioxidante é bastante complexa. Geralmente, ela varia de acordo com os recursos estruturais da molécula e as substituições nos anéis B e C. Essas moléculas podem ter sua capacidade antioxidante aumentada conforme aumenta o grau de hidroxilação no anel B (grupos catecol e pirogalol), quando possuem ligações duplas entre C-2 e C-3 combinadas com um grupo 3-OH no anel C, e ainda, quando ocorrem substituições de grupos -OH no anel B por grupos metoxila capazes de alterar o potencial redox, afetando a capacidade seqüestrante dos flavonóides (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

### 3 MÉTODOS *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Diferentes técnicas são utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir a seleção de substâncias puras e matrizes com esta propriedade. Na Tabela 1 são apresentados alguns dos principais métodos usados

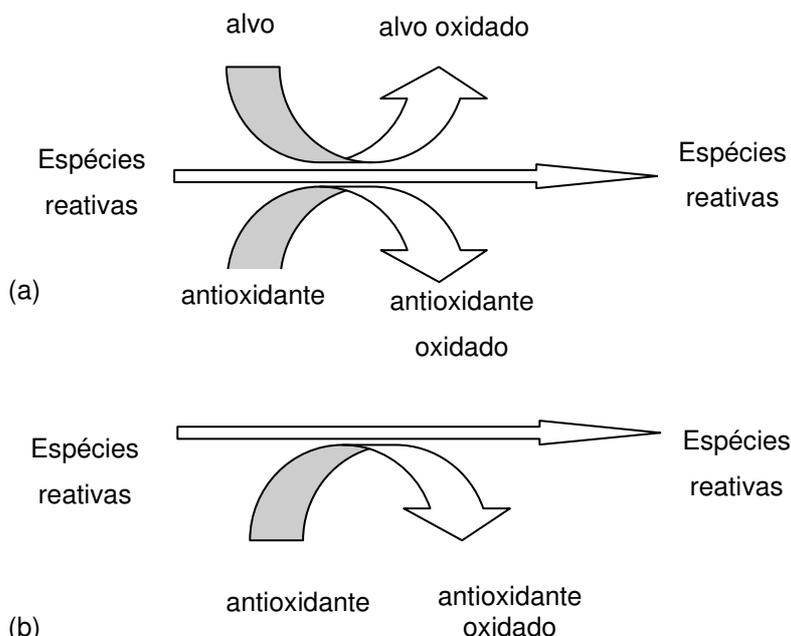
para avaliação da atividade antioxidante, bem como o princípio de cada um. Estas metodologias diferem entre si, em termos do mecanismo da reação envolvida, espécies oxidantes e alvos, condições reacionais e expressão dos resultados. Até mesmo quando um destes métodos é considerado, diferentes padrões de antioxidantes, solventes, tempo de reação e pH são fatores determinantes na atividade antioxidante medida (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; MAGALHÃES et al., 2008). Assim, informações válidas sobre o perfil antioxidante completo de uma matriz alimentar ou composto puro são obtidas pela aplicação de um conjunto de métodos analíticos.

**Tabela 1.** Principais métodos *in vitro* para determinação da atividade antioxidante e seus princípios de ação.

Método	Princípio
ABTS	Transferência de elétrons
DPPH	Transferência de elétrons
FRAP	Transferência de elétrons
ORAC	Transferência de átomo de hidrogênio
TRAP	Transferência de átomo de hidrogênio
$\beta$ -caroteno/ácido linoléico	Transferência de átomo de hidrogênio
Inibição da oxidação do LDL	Transferência de átomo de hidrogênio

Fonte: Huang, Ou e Prior (2005).

Magalhães et al. (2008) classificaram os métodos analíticos sob duas diferentes abordagens, como métodos com esquema competitivo e não-competitivo (Figura 7). No esquema competitivo, a espécie alvo, definida como um composto que representa uma biomolécula que pode ser atacada *in vivo*, e o composto antioxidante competem pelas espécies reativas (radicais ou não-radicalis). Em geral, a avaliação da capacidade antioxidante baseia-se na quantificação da espécie alvo ou da sua forma oxidada. Enquanto isso, em métodos com esquema não-competitivo os prováveis antioxidantes interagem com espécies reativas sem a presença de outra molécula alvo. A avaliação da capacidade antioxidante é monitorada pela quantificação da espécie reativa.



**Figura 7.** Representação esquemática dos métodos competitivos (a) e não-competitivos (b). Fonte: Magalhães et al. (2008).

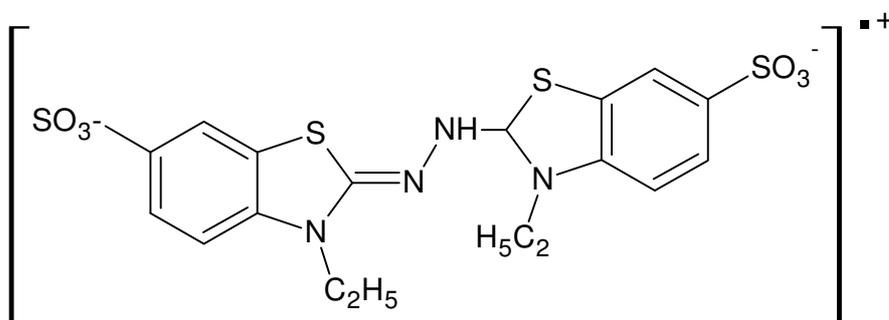
Os métodos ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e FRAP se encaixam no esquema não-competitivo, enquanto o método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico representa um método do tipo método competitivo.

### 3.1 Método ABTS

O método ABTS é baseado na inibição por antioxidantes da absorbância do radical catiônico  $ABTS^{•+}$  (Figura 8), o qual possui um grande espectro de absorção, com quatro comprimentos de onda de absorção máxima: 415, 660, 734 e 820 nm (SANCHEZ-MORENO, 2002). Em termos de condições de análise, estratégias diferentes são implementadas para geração do radical  $ABTS^{•+}$ , tempo e comprimento de onda para monitoramento da reação, e escolha do antioxidante padrão de referência. O radical  $ABTS^{•+}$  pode ser gerado por reação química, usando dióxido de manganês, AAPH (2,2'-azobis amidinopropano dihidroclorídrico) ou persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ), por reação enzimática usando metamioglobina ou peroxidase, ou por geração eletroquímica. Tempos de reação variando de 1 a 30 minutos são adotados em protocolos da literatura, sendo mais usado o tempo de 7 minutos. Quanto ao comprimento de onda de detecção, a determinação a 734 nm é preferida, visto que neste comprimento de

onda a influência de compostos interferentes é reduzida (MAGALHÃES et al., 2008).

Em termos de quantificação da atividade antioxidante, o valor da absorbância, proporcional a concentração de  $ABTS^{*\cdot}$  remanescente, é medida após um tempo de reação fixado e assim determinada a porcentagem de inibição do radical por um composto puro ou extrato. Os resultados são expressos como equivalentes a uma solução de TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), através da construção de uma curva de calibração com concentrações conhecidas de TROLOX ou também como porcentagem de inibição do radical (MAGALHÃES et al., 2008). Um dos protocolos mais utilizados para esta análise é aquele descrito por Re et al. (1999), no qual o radical é gerado numa forma estável pela reação com persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ). Em seqüência, o radical formado é misturado com o antioxidante no meio reacional e a porcentagem de inibição da absorbância a 734 nm é calculada como função da concentração de antioxidantes.



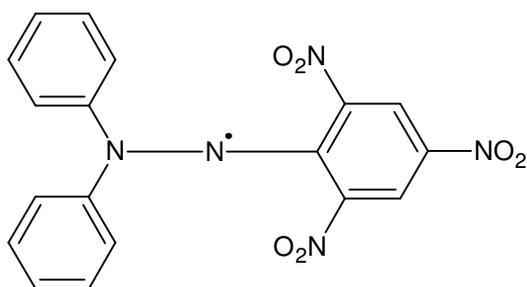
**Figura 8.** Radical  $ABTS^{*\cdot}$ . Fonte: Huang, Ou e Prior (2005).

### 3.2 Método DPPH<sup>•</sup>

O DPPH<sup>•</sup> é um dos poucos radicais estáveis e orgânicos de nitrogênio comercialmente disponíveis (HUANG, OU e PRIOR, 2005). A sua estrutura (Figura 9) é caracterizada por uma valência com um elétron desemparelhado em um átomo de nitrogênio (EKLUND et al., 2005). Neste método o radical cromógeno púrpura (DPPH<sup>•</sup>) é reduzido por compostos antioxidantes para a correspondente hidrazina amarela pálida. A atividade antioxidante é geralmente avaliada em meio orgânico (etanol ou metanol) pelo monitoramento do decaimento da absorbância a

515 – 528 nm por um tempo determinado ou até permanecer constante. O mecanismo da reação é baseado na transferência de elétrons, sendo fortemente influenciada pelo solvente e pelo pH do meio reacional (MAGALHÃES et al., 2008).

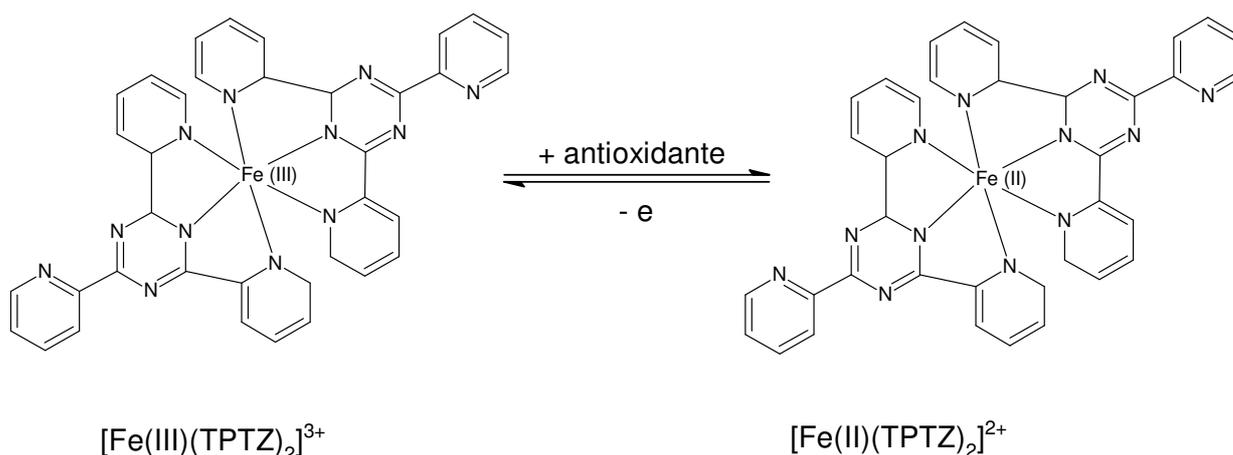
Diferentes autores utilizam protocolos que variam na concentração inicial do radical (22,5 – 250  $\mu\text{M}$ ), tempo de reação (5 – 60 min), solvente e pH reacional. Estas variáveis do método afetam o resultado obtido e por conseqüência tornam difícil uma comparação válida entre resultados de diferentes autores (SHARMA et al., 2009). Apesar disso, é considerado um método válido e fácil para avaliar a atividade antioxidante de compostos puros e/ou extratos complexos, visto que é utilizado um radical estável e que não necessita ser gerado como em outros métodos baseados na neutralização de radicais (SANCHEZ-MORENO, 2002).



**Figura 9.** Estrutura química do radical DPPH $\cdot$ . Fonte: Huang, Ou e Prior (2005).

### 3.3 Método FRAP

O método FRAP mede a habilidade de compostos reduzirem o complexo férrico  $\text{Fe}^{+3}$  – 2,4,6-tripiridil-s-triazina  $[(\text{Fe}^{+3} - (\text{TPTZ})^2)]^{+3}$  para um complexo ferroso  $[(\text{Fe}^{+2} - (\text{TPTZ})^2)]^{+2}$  intensamente azul em meio ácido (Figura 10). A quantificação é feita pela medida da absorbância a 620 nm e a partir da relação com soluções padrões de ferro ou com solução de um antioxidante padrão (MAGALHÃES et al., 2008).



**Figura 10.** Reação de redução do complexo férrico  $[(\text{Fe}^{+3} - (\text{TPTZ})_2)]^{+3}$  para um complexo ferroso  $[(\text{Fe}^{+2} - (\text{TPTZ})_2)]^{+2}$ . Fonte: Huang, Ou e Prior (2005).

### 3.4 Método da co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

Este método avalia a capacidade de neutralização de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas (470 nm) da descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico. A descoloração ocorre em função das estruturas radiculares, que se formam pela oxidação do ácido linoléico, atacam as duplas ligações do  $\beta$ -caroteno, o qual perde seu cromóforo, resultando na perda da cor laranja, característica da solução. Este método determina a capacidade de um extrato ou composto puro proteger um substrato lipídico da oxidação em meio emulsionado. Em geral, se utiliza o BHT (butilhidroxitolueno) como controle positivo para comparação dos resultados (MARCO, 1968; MILLER, 1971; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

## 4 MIRTILO (*Vaccinium* sp.)

### 4.1 Características botânicas e produção

O mirtilizeiro é membro da família Ericaceae, e é classificado na subfamília Vaccinoideae, da qual pertence ao gênero *Vaccinium* (RASEIRA e ANTUNES, 2004). É um arbusto hexaplóide, de folhagem decídua no inverno, de 2 – 4 m de altura, que exige várias horas de frio por ano com temperaturas abaixo de 7,2 °C. Apresenta folhas cartáceas, glabras, de 4 – 8 cm de comprimento. As flores são

formadas durante a primavera quando as plantas ainda estão sem folhas e geralmente são andróginas (HARRI et al., 2006). O mirtilizeiro produz frutos, o mirtilo (Figura 11), com diâmetro entre 8 e 22 mm, de sabor agridoce, com significativo valor de mercado devido ao sabor exótico e pelas suas propriedades funcionais (RASEIRA e ANTUNES, 2004). No mundo existem três grupos principais de mirtilo produzidos comercialmente: os de arbustos baixos “*lowbush*”, os de arbustos altos “*highbush*” e os do tipo olho-de-coelho “*rabbiteye*” (RASEIRA e ANTUNES, 2004).



**Figura 11.** Mirtilo (*Vaccinium* sp.).

No Brasil, as principais cultivares de mirtilo produzidas pertencem ao grupo “*rabbiteye*”. Apresentam como características: elevado vigor, plantas longevas, produtividade alta, tolerância ao calor e à seca, baixa exigência na estação fria, floração precoce, longo período entre floração e maturação, frutos firmes com longa vida pós-colheita se conservados adequadamente. Outra característica que torna as cultivares representantes deste grupo mais cultivadas no Brasil é a menor exigência de horas de frio (temperaturas abaixo de 7,2 °C) que aquelas do grupo “*highbush*”. Elas são capazes de brotar e florescer com apenas 360 horas de frio, enquanto aquelas do grupo “*highbush*” necessitam entre 650 e 800 horas de frio (RASEIRA e ANTUNES, 2004). Assim, este grupo é cultivado principalmente nos Estados Unidos (EUA), Canadá, Austrália, Argentina,

Chile, Nova Zelândia, Holanda, Polônia, Japão, Espanha e França pelas características do clima destes países (STRIK, 2005). Entre as limitações das cultivares do grupo “*rabbiteye*”, destaca-se a completa coloração do fruto antes do ponto ideal da colheita e de alcançar a melhor qualidade em termos de sabor, a tendência de rachar a película em períodos úmidos e o longo período até alcançar o máximo de produtividade (ANTUNES et al., 2008).

A origem do mirtilo está associada a algumas regiões da Europa e América do Norte. Atualmente a produção está concentrada principalmente nos EUA e Canadá. Os EUA são os principais produtores e consumidores, respondendo por 66 % da produção mundial (STRIK, 2005). Apesar de ser cultivado em 35 Estados dos EUA, apenas 10 deles respondem por 97 % da produção. Michigan é o principal produtor de mirtilo para venda na forma congelada e New Jersey é o principal produtor para consumo *in natura* (US Highbush Blueberry Council, 2008).

O cultivo de mirtilo está em franca expansão em países da América do Sul como Chile, Argentina e Uruguai, ocupando uma área de produção de 6500 ha. A expansão da cultura é influenciada, em grande parte, pelo fato da época de colheita nesses países coincidir com a entressafra nos países do Hemisfério Norte, como os EUA (BANÃDOS, 2006). Dentre os países da América do Sul, destaca-se a participação do Chile que produz aproximadamente 7500 t por ano, sendo o país que mais produz e exporta a fruta para o mercado norte-americano, concentrando seu abastecimento entre os meses de janeiro e abril (RASEIRA e ANTUNES, 2004).

O Brasil é um produtor ainda recente de mirtilo. Os primeiros experimentos tiveram início em 1983 sob responsabilidade da Embrapa Clima Temperado de Pelotas (RS), com a introdução da coleção de cultivares de baixa exigência em frio do grupo “*rabbiteye*”, oriundas da Universidade da Flórida (EUA). A região de Vacaria (RS) foi pioneira na produção comercial desta fruta e é a grande referência em termos de produção. Atualmente, o cultivo no país está em expansão, especialmente em regiões de clima temperado, onde há uma grande demanda em relação a cultivares adaptadas às condições edafoclimáticas

regionais (SILVA et al., 2008). Os dados disponíveis de 2004 demonstravam um quadro produtivo estimado em cerca de 60 t, concentradas nos municípios de Vacaria (RS), Caxias do Sul (RS), Barbacena (MG) e Campos do Jordão (SP), totalizando uma área de aproximadamente 35 ha (RASEIRA e ANTUNES, 2004).

#### 4.2 Composição fenólica

O mirtilo (*Vaccinium* sp.) apresenta em sua composição uma alta concentração de compostos fenólicos (PRIOR et al., 1998; MOYER et al., 2002; SELLAPPAN, AKOH e KREWER, 2002; WU et al., 2004), sendo esta superior a maioria das frutas (WOLFE et al., 2008). Estes compostos variam desde moléculas simples como os ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos), flavanóis, flavonóis e antocianinas, até compostos polimerizados como as proantocianidinas (KADER et al., 1996; HÄKKINEN et al., 1999; SELLAPPAN, AKOH e KREWER, 2002; GIOVANELLI e BURATTI, 2009).

Sellappan, Akoh e Krewer (2002) identificaram e quantificaram os ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos de cultivares de mirtilo produzidas na Geórgia (EUA). Encontraram os ácidos fenólicos gálico, p-hidroxibenzóico, p-cumárico, ferúlico e caféico. O ácido elágico foi encontrado em apenas algumas cultivares avaliadas. Do grupo dos flavonóides não-antociânicos foram encontrados os flavanóis catequina e epicatequina, e como representantes dos flavonóis a quercetina, a miricetina e o kaempferol.

Taruscio, Barney e Exon (2004) avaliaram a composição fenólica (ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos) de cultivares de mirtilo pertencentes a nove espécies do gênero *Vaccinium*. A (-)-epicatequina foi o flavanol predominante, seguido da catequina. Entretanto, em algumas espécies a catequina não foi detectada ( $< 5 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). Do grupo dos flavonóis foram identificados e quantificados a quercetina e miricetina, sendo não detectada a presença do kaempferol. Neste trabalho o ácido clorogênico foi encontrado como componente fenólico majoritário em todas as cultivares avaliadas.

Zadernowski, Naczek e Nesterowicz (2005) identificaram 17 ácidos fenólicos presentes em algumas cultivares de mirtilo por cromatografia gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massa (EM). Encontraram os ácidos benzóicos: gentísico, gálico, o-pirocatecuico, protocatecuico, salicílico, siríngico, vanílico, verátrico. Como representantes dos ácidos cinâmicos, encontraram os ácidos caféico, m-cumárico, o-cumárico, p-cumárico, 3,4-dimetoxicinâmico, ferúlico, hidroxicaféico e sinápico.

Zheng e Wang (2003) identificaram um grande número de compostos fenólicos presentes no mirtilo. O diferencial deste trabalho foi a determinação destes compostos na forma glicosilada, ou seja, sem aplicar a etapa de hidrólise. Assim, foram encontrados os flavonóis miricetina-3-arabinosídeo, quercetina-3-galactosídeo, quercetina-3-glicosídeo, quercetina-3-arabinosídeo, quercetina-3-ramnosídeo e derivados do kaempferol. As antocianinas encontradas foram delphinidina-3-galactosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-arabinosídeo, cianidina-3-arabinosídeo, cianidina-3-galactosídeo, cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-xilosídeo, petunidina-3-galactosídeo, petunidina-3-glicosídeo, petunidina-3-arabinosídeo, malvidina-3-galactosídeo, malvidina-3-glicosídeo, malvidina-3-arabinosídeo, peonidina-3-galactosídeo, peonidina-3-glicosídeo e peonidina-3-arabinosídeo.

Em trabalho recente de Lohachoompol et al. (2008) foram identificadas as antocianinas presentes em cultivares de mirtilo produzidas na Austrália. As cultivares estudadas foram: Crunchie, Star e Sharpe (*“highbush”, Vaccinium corymbosum*); Clímax, Powderblue e Brightwell (*“rabbiteye”, Vaccinium ashei*). Foram identificadas as antocianinas: delphinidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-galactosídeo, cianidina-3-galactosídeo, delphinidina-3-arabinosídeo, cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-galactosídeo, cianidina-3-arabinosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-galactosídeo, petunidina-3-arabinosídeo, peonidina-3-glicosídeo, malvidina-3-galactosídeo, peonidina-3-arabinosídeo, malvidina-3-glicosídeo e malvidina-3-arabinosídeo. As antocianinas majoritárias encontradas foram a delphinidina, petunidina e malvidina. Neste trabalho foram verificados alguns picos que possivelmente seriam antocianinas aciladas, porém não foi possível identificá-los.

### 4.3 Fatores que afetam o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante

A composição fenólica do mirtilo (*Vaccinium* sp.) demonstrada acima, apresenta grande variação qualitativa e quantitativa. Vários trabalhos demonstraram que esta variação é dependente de fatores intrínsecos (gênero, espécie e cultivar) e extrínsecos (condições ambientais e de cultivo, manejo e condições de armazenamento) (KALT et al., 1999; CONNOR, LUBY e TONG, 2002; WANG et al., 2008; GIOVANELLI e BURATTI, 2009). Além disso, fatores como a complexidade dos compostos fenólicos, métodos de extração e quantificação também podem afetar a composição deste grupo de compostos. A alteração no conteúdo fenólico tem como consequência direta uma grande variabilidade na atividade antioxidante apresentada por esta fruta.

O mirtilo proveniente de quatro espécies (*Vaccinium corymbosum*, *Vaccinium ashei* Reade, *Vaccinium angustifolium* e *Vaccinium myrtillus*) foi estudado por Prior et al. (1998). Os autores verificaram grande variação na concentração de compostos fenólicos, antocianinas e na atividade antioxidante entre as espécies e ainda entre cultivares representantes da mesma espécie. O efeito da maturação, avaliado para as cultivares Brightwell e Tifblue, mostrou um aumento na concentração de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de ambas cultivares ao longo da maturação. Foi observado um aumento de 169, 261 e 224 %, na concentração de compostos fenólicos, antocianinas e na atividade antioxidante, respectivamente, para a cv. Brightwell. Em contrapartida, o local de cultivo (Oregon, Michigan e New Jersey (EUA)) não apresentou influência sobre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante da cv. Jersey.

Moyer et al. (2002) avaliaram 9 espécies e 30 cultivares de mirtilo quanto ao teor de antocianinas, compostos fenólicos e atividade antioxidante (métodos ORAC e FRAP). Encontraram uma grande variação nos níveis de compostos fenólicos e na atividade antioxidante entre espécies e entre cultivares do gênero *Vaccinium*. A atividade antioxidante medida pelo método ORAC apresentou intervalo de valores 19 até 131  $\mu\text{mol TROLOX} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  em peso fresco. A cultivar Summit (*Vaccinium corymbosum*) foi avaliada durante o amadurecimento. Foi observada, ao longo deste período, uma elevação na concentração de

antocianinas, fenólicos totais, ORAC e FRAP de 163, 175, 182 e 129 %, respectivamente.

A alteração da composição qualitativa e quantitativa dos compostos fenólicos de cultivares de mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) foi investigada durante o amadurecimento da fruta por Castrejón et al. (2008). Houve diminuição dos ácidos hidroxinâmicos e flavonóis ao longo do amadurecimento bem como do conteúdo de fenólicos totais e da atividade antioxidante. Os valores para fenólicos totais variaram de 60,76 para 33,00 mg EAG.100 g<sup>-1</sup> em peso seco, do estágio inicial até o final do amadurecimento, respectivamente.

Connor, Luby e Tong (2002) avaliaram a influência da cultivar, do local e época de cultivo sobre o conteúdo fenólico e atividade antioxidante do mirtilo. As cultivares, tanto do mesmo local como de locais diferentes de produção, apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no conteúdo fenólico total, antocianinas e na atividade antioxidante. Também foi encontrada variação na atividade antioxidante entre duas safras (1998 e 1999), dentro de um mesmo local de produção. Estas mudanças provocaram uma alteração no ranqueamento das cultivares de acordo com seu conteúdo de fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante nos dois anos de estudo. Foi demonstrado assim, que existe uma interação entre genótipo (cultivar) e ambiente na determinação da atividade antioxidante do mirtilo.

A influência do sistema de cultivo (orgânico e convencional) sobre a composição fenólica e atividade antioxidante foi analisada por Wang et al. (2008). Os resultados deste trabalho mostraram que o mirtilo (*Vaccinium corymbosum*, cv. Bluecrop) produzido em sistema orgânico apresenta concentração superior de compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante do que aqueles produzidos em sistema convencional. A avaliação dos compostos fenólicos individuais mostrou uma maior concentração de miricetina-3-arabinosídeo, quercetina-3-glicosídeo, delphinidina-3-galactosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-arabinosídeo, petunidina-3-galactosídeo, petunidina-3-glicosídeo e malvidina-3-arabinosídeo para o mirtilo cultivado em sistema orgânico.

Lohachoompol et al. (2008) identificaram e quantificaram antocianinas em várias cultivares de mirtilo produzidas na Austrália. Em todas as cultivares avaliadas, observou-se um perfil qualitativo similar para as antocianinas, porém a proporção da cada antocianina individual foi dependente da cultivar. As cultivares representantes da espécie *Vaccinium ashei* apresentaram um conteúdo de antocianinas totais significativamente superior ao da espécie *Vaccinium corymbosum*.

As condições e o tempo de armazenamento dos extratos produzidos também são fatores determinantes no conteúdo fenólico total e na atividade antioxidante medida. Srivastava et al. (2007) avaliaram o efeito da temperatura ( $-20 \pm 1$ ;  $5 \pm 1$ ;  $23 \pm 1$ ; e  $35 \pm 1$  °C) e tempo de armazenamento (15, 30, 45 e 60 dias) sobre os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de extratos de mirtilo. Não houve perda significativa ( $p < 0,05$ ) durante 30 dias de armazenamento para compostos fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante a  $-20$  °C. Porém, houve perda significativa ( $p < 0,05$ ) de compostos fenólicos e diminuição da atividade antioxidante quando armazenados em temperaturas de 5, 23 e 35 °C.

#### 4.4 Propriedades funcionais

Estudos epidemiológicos e *in vitro* sugerem que o mirtilo (*Vaccinium* sp.) pode ajudar a manter a saúde e atuar como obstáculo aos efeitos do envelhecimento, particularmente com respeito à neurodegeneração e defeitos cognitivos. Há ainda evidências de sua atuação na prevenção de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (SWEENEY et al., 2002; DUFFY et al., 2008). Muitos dos efeitos benéficos parecem estar relacionados às propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos presentes na fruta (KALT e DUFOUR, 1997).

Duffy et al. (2008) realizaram um estudo com modelos animais e verificaram que a suplementação da dieta com 2 % de extrato de mirtilo por 8 semanas protegeu os ratos contra a neurodegeneração e defeitos cognitivos mediados por excitotoxicidade e estresse oxidativo. Este trabalho trouxe

evidências de que a suplementação com extrato de mirtilo pode ser utilizada para prevenir ou tratar a doença de Alzheimer, e possivelmente outras desordens neurodegenerativas. A ação do extrato como neuroprotetor parece estar relacionada a múltiplos mecanismos, sendo sugerido que o extrato atenua processos degenerativos causados por estressores oxidativos ou inflamatórios.

Wolfe et al. (2008) avaliaram a atividade antioxidante de 25 tipos de frutas, comumente consumidas nos EUA, e encontraram o mirtilo como uma das frutas com maior atividade antioxidante em sistema de cultura de células. Também foi observada uma alta correlação entre o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante celular, demonstrando que o primeiro pode ser usado como um indicador da atividade antioxidante apresentada pela fruta. Os resultados deste trabalho indicam o possível efeito do extrato do mirtilo sobre a atenuação de eventos oxidativos nas células, diminuindo assim o risco de câncer.

Há trabalhos que sugerem outro mecanismo de ação para explicar a diminuição do risco de câncer apresentada pelo mirtilo. Seeram et al. (2006) verificaram a propriedade de extratos do mirtilo em inibir a proliferação de células tumorais na cavidade oral, mama, cólon e próstata, sendo esta ação dose-dependente e com diferentes níveis de potência entre os tipos de células avaliadas. Além disso, os extratos apresentaram ação de estimulação da apoptose em culturas de células de câncer de cólon. Em 2007, Boivin et al., avaliaram o efeito de suco de mirtilo sobre a apoptose e sobre a interrupção do ciclo celular de células humanas cancerígenas do estômago, mama, próstata e intestino. Estes autores verificaram uma grande capacidade do suco em inibir o crescimento celular, principalmente para o suco derivado das cultivares do grupo "*lowbush*". O mecanismo de ação parece estar relacionado à interrupção do ciclo celular, mais do que à apoptose caspase-dependente.

Em outro trabalho foram avaliadas frações de compostos fenólicos de três cultivares de mirtilo (Briteblue, Tifblue e Powderblue) quanto à sua ação antiproliferativa e na indução da apoptose de células hepáticas cancerosas (Yl et al., 2006). Observou-se um grande efeito inibitório da fração das antocianinas, com 50 % de inibição do crescimento da população de células cancerosas. A

indução da apoptose foi avaliada pela fragmentação do DNA, sendo que a fração das antocianinas resultou em um aumento de 2 – 4 vezes na apoptose comparado ao controle.

A ação dos componentes fenólicos do mirtilo na redução de um dos fatores de risco das doenças cardiovasculares foi demonstrado por Kalt et al. (2008). Um experimento com suínos demonstrou que a suplementação com extrato de mirtilo (*Vaccinium corymbosum*, cv. Jersey) reduziu os níveis de colesterol total, LDL e HDL. A maior redução foi observada com mirtilo na concentração de 2 %, sendo que o colesterol total, LDL e HDL reduziram, 11,7, 15,1 e 8,3 %, respectivamente

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RASEIRA, M. C. B.; ANTUNES, L. E. C. (Ed.). **A cultura do Mirtilo (*Vaccinium sp.*)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004, 67 p. (Séria Documentos, 121).

ANTUNES, L. E. C.; GONÇALVES, E. D.; RISTOW, N. C.; CARPENEDO, S.; TREVISAN, R. Fenologia, produção e qualidade de frutos de mirtilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1011 – 1015, 2008.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies, **Food Chemistry**, v. 84, p. 551 – 562, 2004.

ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1 – 9, 2007.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191 – 203, 2006.

BANÃDOS, M. P. Blueberry production in South America. **Acta Horticulturae**, n. 715, p. 165 – 172, 2006.

BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 101 – 110, 2000.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J. A. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4505 – 4515, 1997.

BOIVIN, D.; BLANCHETTE, M.; BARRETTE, S.; MOGHRABI, A.; BELIVEAU, R. Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF induced activation of NFkappaB by edible berry juice. **Anticancer Research**, v. 27, p. 937 – 948, 2007.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 11, p. 317 – 333, 1998.

BRIDLE, P; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. **Food Chemistry**, v. 58, p. 103 – 109, 1997.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. London: Academic Press, 1982, p. 1 – 40.

CAMIRE, M. E.; CHAOVANALIKIT, A.; DOUGHERTY, M. P.; BRIGGS, J. Blueberry and grape anthocyanins as breakfast cereal colorants. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 438 – 431, 2002.

CASTAÑEDA-OVANDO; A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, DE L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859 – 871, 2009.

CASTREJÓN, A. D. R.; EICHHOLZ, I.; ROHN, S.; KROH, L. W.; HUYSKENS-KEIL, S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium*

*corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. **Food Chemistry**, v. 109, p. 564 – 572, 2008.

CONNOR, A. M.; LUBY, J. J.; TONG, C. B. S. Genotype and enviromental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 127, p. 89 – 97, 2002.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**, v.7, p. 66 – 76, 1996.

DAI, Q.; BORENSTEIN, A. R.; WU, YI; JACKSON, J. C.; LARSON, E. B. Fruit and vegetables juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. **The American Journal of Medicine**, v. 119, p. 751 – 759, 2006.

DÁVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Commercial dietary antioxidant supplements assayed for their antioxidant activity by different methodologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2512 – 2519, 2003.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 173 – 289, 2000.

DOROSHOW, J. H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, v. 43, p. 460 – 472, 1983.

DONELLI, J. K.; ROBINSON, D. S. Free radical in foods. **Free Radical Research**, v. 22, p. 147 – 176, 1995.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e

método de seqüestro de radicais DPPH'. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 2, v. 26, p. 446 – 452, 2006.

DUFFY, K. B.; SPANGLER, E. L.; DEVAN, B. D.; GUO, Z.; BOWKER, J. L.; JANAS, A. M.; HAGEPANOS, A.; MINOR, R. K.; DECABO, R. ; MOUTON, P. R.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A.; INGRAM, D. K. A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats. **Neurobiology of Aging**, v. 29, p. 1680 – 1689, 2008.

EKLUND, P. C.; LANGVIK, O. K.; WARNA, J. P.; SALMI, T. O.; WILLFOR, S. M.; SJOHOLM, R. E. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 21, p. 3336 – 3347, 2005.

FEILD, T. S.; LEE, D. W.; HOLBROOK, N. M. Why Leaves Turn Red in Autumn. The Role of Anthocyanins in Senescing Leaves of Red-Osier Dogwood. **Plant Physiology**, v. 127, p. 566 – 574, 2001.

FRANCIS, F. J. Food Colorants: Anthocyanins. **Critical Reviews. Food Science and Nutrition**, v. 28, 273 – 314, 1989.

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

GIOVANELLI, G.; BURATTI, S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. **Food Chemistry**, v. 112, p. 903 – 908, 2009.

GOODWIN, J. S.; BRODWICK, M. Diet, aging, and cancer. **Clinical Geriatric Medicine**, v. 11, p. 577 – 589, 1995.

HÄKKINEN, S.; HEINONEN, M.; KÄRENLAMPI, S.; MYKKÄNEN, H.; RUUSKANEN, J.; TÖRRÖNEN, R. Screening of selected flavonoids and phenolics acids in 19 berries. **Food Research International**, v. 32, p. 345 – 353, 1999.

HALLIWELL, B.; AESCHBACHT, R.; LOLIGERT, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 33, p. 601 – 617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. New Yor: Clarendon Press; Oxford: Oxford University Press. 1999.

HARRI, L.; SARTORI, S.; BACHER, L. B.; LACERDA, M. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 937 – 942, 1999.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 1841 – 1856, 2005.

ISHIKURA, N. A survey of anthocyanins in fruits of some angiosperms, I. **Journal of Plant Research**, v. 88, p. 41 – 45, 1975.

ISHIKURA, N.; SUGAHARA, K. A survey of anthocyanins in fruits of some angiosperms, II. **Journal of Plant Research**, v. 92, 1979.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. **Natural Food Colorants**. London: Blackie Academic, 1992, p. 183 – 241.

KADER, F.; ROVEL, B.; GIRARDIN, M.; METCHE, M. Fractionation and identification of the phenolics compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.). **Food Chemistry**, v. 55, p. 35 – 40, 1996.

KALT, W.; FOOTE, K.; FILLMORE, S. A. E.; LYON, M.; LUNEN, T. A. V.; McRAE K. B. Effect of blueberry feeding on plasma lipids in pigs. **British Journal of Nutrition** v. 100, p. 70 – 78, 2008.

KALT, W.; FORNEY, C. F.; MARTIN, A.; PRIOR, R. L. Antioxidant capacity, vitamin c, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 4638 – 4644, 1999.

KALT, W.; DUFOUR, D. Health functionality of blueberries. **Horticultural Technology**, v. 7, p. 216 – 221, 1997.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 36, p. 703 – 725, 2001.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolics phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, p. 213 – 218, 1999.

KONCZAK, I.; ZHANG, W. Anthocyanins - more than nature's colours. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 5, p. 239 – 240, 2004.

LEE, H. S.; HONG, V. Chromatography analysis of anthocyanins. **Journal of Chromatography**, v. 624, p. 221 – 234, 1992.

LOHACHOOMPOL, V.; MULHOLLAND, M.; SRZEDNICKI, G.; CRASKE, J. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. **Food Chemistry**, v. 111, p. 249 – 254, 2008.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L.. F. C. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1 – 19, 2008.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 45, 594 – 598, 1968.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, G.G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed., ver., Porto Alegre /Florianópolis, Ed. Universidade/ UFGRS/ Ed. da UFSC, 2007.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MOYER, R. A.; HUMMER, K. E.; FINN, C. E.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 519 – 525, 2002.

NATELLA, F.; NARDINI, M.; DI FELICE, M; SCACCINI, C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1453 – 1459, 1999.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95 – 111, 2004.

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

NÖTHLINGS, U.; SCHULZE, M. B.; WEIKERT, C.; BOEING, HEINER; SCHOUW, Y. T. V. D.; BAMIA, C.; BENETOU, V.; LAGIOU, P.; KROGH, V.; BEULENS, J. W. J.; PEETERS, P. H. M.; HALKJÆR, J.; TJØNNELAND, A.; TUMINO, R.; PANICO, S.; MASALA, G.; CLAVEL-CHAPELON, F.; LAUZON, B.; BOUTRON-RUAULT, M-C; VERGAMBRE, M-N; KAAKS, R.; LINSEISEN, J.; OVERVAD, K.; ARRIOLA, L.; ARDANAZ, E.; GONZALEZ, C. A.; TORMO, M-J; BINGHAM, S.; KHAW, K-T; KEY, T. J. A.; VINEIS, P.; RIBOLI, E.; FERRARI, P.; BOFFETTA, P.; BUENO-DE-

MESQUITA, H. B.; VAN DER A, D. L.; BERGLUND, G. R.; WIRFÄLT, E.; HALLMAN, G. S.; JOHANSSON, I.; LUND, E.; TRICHOPOULO, A. Intake of vegetables, legumes, and fruit, and risk for all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in a european diabetic population. **Nutritional Epidemiology**, v. 138, p. 775 – 781, 2008.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035 – 1042, 2000.

PRIOR, R. L.; CAO, G. H.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; McEWEN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W. KREWER, G.; MAINLAND, C. M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, 2686 – 2693, 1998.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 494 – 507, 2001.

RASEIRA, M. B. C.; ANTUNES, L. E. C. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. (Documento 121)

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231 – 1237, 1999.

RICE-EVANS, C. A. Flavonoids antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 797 – 807, 2001.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 121 – 137, 2002.

SANTOS, A. M. Situação e perspectiva do mirtilo no Brasil. Embrapa Clima Temperado Pelotas, RS. **Série Documentos**, n. 134, p. 282 – 285, 2004.

SEERAM, N. P.; NAIR, M. G. Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity-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.; ADAMS, L. S.; ZHANG, Y.; SAND, D.; HEBER, D. 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.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 32, p. 67 – 103, 1992.

SHARMA, O. P. ; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1202 – 1205, 2009.

SILVA, S. D. A. E.; ANTUNES, L. E. C.; ANTHONISEN, D. G.; LEMÕES, J. S.; GONÇALVES, E. D. Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 180 – 184, 2008.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71 – 81, 2002.

SRIVASTAVA, A.; AKOH, C. C.; YI, W.; FISCHER, J.; KREWER, G. Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2705 – 2713, 2007.

STRIK, B. Blueberry: An expanding world berry crop. **Horticultural Sciences Focus**, v. 45, p. 7 – 12 , 2005.

SWEENEY, M. I.; KALT, W.; MACKINNON, S. L.; ASHBY, J.; GOTTSCHALL-PASS, K. T. Feeding rats diets enriched in lowbush blueberries for six weeks decreases ischemia-induced brain damage. **Nutritional Neuroscience**, v. 5, p. 427 – 431, 2002.

TARUSCIO, T. G.; BARNEY, D. L.; EXON, J. Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *Vaccinium* berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3169 – 3176, 2004.

TRICHOPOULOU, A.; CORELLA, D.; MARTINEZ-GONZALEZ, M. A.; SORIGUER, F.; ORDOVAS, J. M. The mediterranean diet and cardiovascular epidemiology. **Nutrition Reviews**, v. 4, p. 13 – 19, 2008.

US Highbush Blueberry Council. **North american highbush blueberry market situation**. Disponível: <<http://www.blueberry.org/>>. Acesso em: 31 de outubro de 2008.

VECCHIA, C. L. Mediterranean diet and cancer. **Public Health Nutrition**, v. 7, p. 965 – 968, 2004.

WANG, S. Y.; CHEN, C-T; SCIARAPPA, W.; WANG, C. Y.; CAMP, M. J. Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56 , p. 5788 – 5794, 2008.

WEIJL, N. I., CLETON, F. J., OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, v. 23, p. 209 – 240, 1997.

WOLFE, K. L.; KANG, X.; HE, X.; DONG, M.; ZHANG, Q.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8418 – 8426, 2008.

WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in Food Science and Technology**, v.16, p. 423 – 428, 2005.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the united states. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4026 – 4037, 2004.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 381 – 406, 2001.

YI, W.; AKOH, C. C.; FISCHER, J.; KREWER, G. Effects of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes on HepG2 cell viability and apoptosis. **Food Research International**, v. 39, p. 628 – 638, 2006.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic Acid profiles in some small berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2118 – 2124, 2005.

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.

## **CAPÍTULO 2**

### **COMPOSTOS FENÓLICOS, ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE CULTIVARES DE MIRTILO (*Vaccinium* sp.) PRODUZIDAS NO BRASIL**

## COMPOSTOS FENÓLICOS, ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE CULTIVARES DE MIRTILO (*Vaccinium* sp.) PRODUZIDAS NO BRASIL

Eliseu Rodrigues<sup>1\*</sup>, Naira Poerner<sup>2</sup>, Ismael Ivan Rockenbach<sup>1</sup>, Luciano Valdemiro Gonzaga<sup>1</sup>, Camila Ribas Mendes<sup>1</sup>, Roseane Fett<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

### RESUMO

O mirtilo (*Vaccinium* sp.) é considerado uma das frutas mais ricas em compostos fenólicos, sendo a concentração destes afetada significativamente por fatores genéticos (espécie e cultivar) e também pelas condições de cultivo (ambiente e técnicas de cultivo). O objetivo deste trabalho foi avaliar a concentração de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais e a atividade antioxidante *in vitro* das principais cultivares de mirtilo produzidas no Brasil. O método Folin-Ciocalteu foi aplicado para quantificar os compostos fenólicos totais e os métodos ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), FRAP (poder de redução do ferro) e  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico para avaliar a atividade antioxidante. O teor de compostos fenólicos totais encontrado variou de 274,48 a 694,60 mg de equivalente a ácido gálico (EAG).100 g<sup>-1</sup> em peso fresco (PF). As cultivares Clímax (*Vaccinium ashei* Reade) e Bluecrop (*Vaccinium corymbosum*) apresentaram a maior e a menor concentração de compostos fenólicos totais, respectivamente. A concentração de antocianinas monoméricas variou da cultivar Bluecrop até a Tifblue, com valores de, respectivamente, 40,62 a 378,31 mg.100 g<sup>-1</sup> PF. A atividade antioxidante medida pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP mostrou grande amplitude entre as cultivares estudadas, com valores variando de, respectivamente, 1238,48 a 2445,96, 1014,24 a 2055,06 e 699,78 a 1740,25  $\mu$ mol TEAC.100 g<sup>-1</sup> PF. Foi encontrada uma correlação moderada entre a atividade antioxidante e a concentração de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais. Os resultados confirmam o mirtilo (*Vaccinium* sp.) como fonte de compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante. Demonstram ainda que existem diferentes níveis de concentrações de compostos fenólicos e atividade antioxidante de acordo com a cultivar e o local de produção desta fruta.

**Palavras-chave.** Mirtilo, cultivares, atividade antioxidante.

## ABSTRACT

Blueberry (*Vaccinium* sp.) is considered one of the richest fruit in antioxidant compounds, being the content of these compounds significantly influenced by type of fruit (specie and cultivar) and grow conditions (environment and production techniques). The aim of the present work was to evaluate the phenolic compounds content, total monomeric anthocyanins content and the antioxidant potential of blueberry cultivars grown in Brazil. Folin-Ciocalteu method was applied in order to quantify phenolic compounds and methods ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin)-6-sulfonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (ferric reducing antioxidant power) and  $\beta$ -carotene/linoleic acid were applied in order to evaluated antioxidant activity. Phenolic compounds content ranged from 274.48 to 694.60 mg as gallic acid equivalent (GAE).100 g<sup>-1</sup> in fresh weight (FW). Cultivars Clímax (*Vaccinium ashei* Reade) and Bluecrop (*Vaccinium corymbosum*) presented the highest and lowest concentration of total phenolic compounds, respectively. Monomeric anthocyanins content ranged from 40.62 to 378.31 mg.100 g<sup>-1</sup> FW for Bluecrop and Tifblue respectively. Antioxidant activities assessed by ABTS, DPPH and FRAP methods presented significant differences among studied cultivars, ranging from 1238.48 to 2445.96, 1014.24 to 2055.06 and 699.780 to 1740.25  $\mu$ mol TEAC.100 g<sup>-1</sup> FW, respectively. There was a moderate correlation between antioxidant activities measured and concentrations of anthocyanins and phenolic compounds. Results confirm the blueberry as a source of phenolic compounds with high antioxidant activity. Also show that there are different levels of concentrations of phenolic compounds and antioxidant activity according to the cultivar and location production.

**Keywords.** Blueberry, cultivars, antioxidant activity.

## INTRODUÇÃO

Radicais livres e outras espécies reativas podem causar danos oxidativos a biomoléculas quando as espécies oxidantes excedem as defesas antioxidantes do organismo, resultando no estresse oxidativo. Este está associado ao envelhecimento, bem como ao desenvolvimento de patologias como câncer, doenças cardiovasculares, desordens neurodegenerativas, diabetes e inflamação (DUFFY et al., 2007; MATEOS e BRAVO, 2007; LU e FINKEL, 2008). Em contrapartida, evidências demonstram relação entre uma dieta rica em frutas e vegetais e a diminuição de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer, o que, por hipótese, é devido ao conteúdo de antioxidantes (GERMAN e WALZEM, 2000; KAUR e KAPOOR, 2001; YANG et al., 2001; GARCIA-ALONSO et al., 2004). Esta relação tem estimulado pesquisas sobre a capacidade antioxidante de frutas e vegetais.

Dentre os compostos com propriedades antioxidantes encontrados em frutas e vegetais, destacam-se os compostos fenólicos. Estes respondem pela maior parte da atividade antioxidante apresentada por muitas plantas (DUTHIE e CROZIER, 2000). Ocorrem naturalmente nas plantas como metabólitos secundários, estando presentes em frutas, vegetais, folhas, nozes, sementes e flores. São parte integrante da dieta humana e também são colocados intencionalmente em algumas preparações de medicamentos (WU et al., 2004). As pequenas frutas, conhecidas como “berries”, são muito ricas em compostos fenólicos e apresentam atividade antioxidante elevada (SEERAM, 2008; WOLFE et al., 2008), sendo interessantes como ingredientes para uso em sucos, geléias, sorvetes e coberturas de bolos, além de serem usadas com sucesso no desenvolvimento de alimentos funcionais com objetivo de promover a saúde (POTTER et al., 2007). Dentre as “berries”, destaca-se o mirtilo (*Vaccinium* sp.), que é representado por várias espécies e cultivares, sendo que algumas apresentam atividade antioxidante significativamente superior a outras (PRIOR et al., 1998; MOYER et al., 2002).

A produção de mirtilo está concentrada principalmente nos EUA e Canadá, sendo o primeiro responsável por 66 % e o segundo por 33 % da produção mundial (STRIK, 2005). Enquanto isso, o Brasil é um produtor recente de mirtilo, com uma pequena produção concentrada nas regiões Sul e Sudeste do país, nos municípios de Vacaria e Caxias do Sul (Rio Grande do Sul, RS), Barbacena (Minas Gerais, MG) e Campos do Jordão (São Paulo, SP) (SANTOS, 2004). Considerando a escassez de informações sobre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante do mirtilo produzido no país, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a concentração de compostos fenólicos, antocianinas monoméricas totais e a atividade antioxidante *in vitro* das principais cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Reagentes**

2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH<sup>\*</sup>), β-caroteno, ácido linoléico, BHT (2,6-di-tert-butil-4-metil fenol), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) e ácido gálico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha). O reagente Folin-Ciocalteu, 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) e monopalmitato de polioxietilenosorbitana (Tween 40) foram adquiridos da Fluka Chemie AG (Buchs, Suíça). Metanol, clorofórmio, cloreto férrico, carbonato de sódio, acetona, ácido clorídrico, hidróxido de sódio e persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) foram adquiridos da Vetec (São Paulo, Brasil).

## **Amostragem**

As amostras de mirtilo foram coletadas diretamente nos produtores (safra 2008) no Estado do Rio Grande do Sul – RS (Região Sul), nos municípios de Pelotas, Caxias do Sul e Vacaria; Estado de São Paulo – SP (Região Sudeste), município de Campos do Jordão; Estado de Minas Gerais – MG (Região Sudeste), município de Barbacena. No trabalho foram utilizadas as cultivares: Bluecrop (*Vaccinium corymbosum*); Delite, Woodard, Clímax, Bluegem, Flórida M, Powderblue, Briteblue, Bluebelle, Tifblue (*Vaccinium ashei* Reade). A coleta das amostras foi efetuada de modo aleatório, resultando em 3 (três) amostras de 500 g de cada cultivar. As amostras foram transportadas para o laboratório a  $5,0 \pm 1,0$  °C, onde foram separadas em embalagens plásticas em porções de 100 g. Estas embalagens foram desoxigenadas com fluxo de nitrogênio por 5 min, sendo então congeladas e armazenadas a  $-18,0 \pm 0,5$  °C até o momento das análises. Cuidado especial foi tomado na seleção das frutas para evitar aquelas com danos, não-maduras ou muito maduras.

## **Métodos**

### **Preparo dos extratos**

Amostra de mirtilo triturado (2,000 g) foi extraída com 60 mL de metanol em equipamento de ultra-som USC-1400 (Unique) por 15 minutos. O extrato foi centrifugado a 2000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado em frasco

âmbar. Este extrato foi usado na determinação de compostos fenólicos totais (FT) e para as análises de atividade antioxidante (AA).

Amostra de mirtilo triturado (1,500 g) foi extraída com 15 mL de metanol acidificado (0,1 % HCl) em equipamento de ultra-som USC-1400 (Unique) por 30 minutos. O extrato foi centrifugado a 2000 *g* por 10 minutos e o sobrenadante usado para avaliação do teor de antocianinas monoméricas totais (AMT).

### **Determinação de compostos fenólicos totais (FT)**

O teor de FT foi determinado espectrofotometricamente (Hewlett-Packard 8452A) usando o reagente Folin-Ciocalteu, com a leitura da absorbância a 765 nm (SINGLETON e ROSSI, 1965). Neste método a mistura dos ácidos fosfowolfrâmico e fosfomolibdico se reduz, em meio básico, ao oxidar os compostos fenólicos, originando os óxidos azuis de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) e molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ) (KUSKOSKI et al., 2006). A quantificação foi feita a partir de uma curva de analítica ( $R^2 = 0,9983$ ) com ácido gálico nas concentrações de 50, 100, 150, 250 e 500  $mg.L^{-1}$ . Os resultados foram expressos em mg de equivalente a ácido gálico (EAG). $100 g^{-1}$  em peso fresco (PF) .

### **Determinação de antocianinas monoméricas totais (AMT)**

A estimativa do conteúdo de AMT foi feita espectrofotometricamente (Hewlett-Packard 8452A) de acordo com o método de diferença de pH (GIUSTI e WROLSTAD, 2001). A absorbância dos extratos diluídos foi medida no comprimento de onda de máxima absorção e a 700 nm, sendo feito um branco com água desionizada. Os resultados, em PF, foram expressos como concentração de pigmentos monoméricos em  $mg.100 g^{-1}$  de equivalente a cianidina-3-glicosídeo ( $\epsilon = 26900$ ,  $PM = 449,2$ ), de acordo com as seguintes equações:

$$A = (A_{m\acute{a}x.} - A_{700\text{ nm}})_{pH1.0} - (A_{m\acute{a}x.} - A_{700\text{ nm}})_{pH4.5} \quad (\text{Equa\c{c}\~ao 1})$$

$$\text{Antocianinas em cianidina-3-glicosídeo (mg.100 g}^{-1}\text{)} = \frac{A \times MM \times Fd \times 1000}{\epsilon \times l} \text{ (Equação 2)}$$

Onde:

A = absorvância

MM = massa molar da antocianina majoritária (449,2)

Fd = fator de diluição

$\epsilon$  = absorvidade molar (26900)

### **Atividade antioxidante (AA) - Método ABTS**

O método ABTS foi realizado conforme descrito por Re et al. (1999). A absorvância foi medida a 734 nm (Hewlett-Packard 8452A) no tempo inicial e após 7 min da adição de cada extrato. A atividade antioxidante do mirtilo, em PF, foi calculada em  $\mu\text{mol.100 g}^{-1}$  de TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

### **Atividade antioxidante (AA) - Método DPPH\***

O método DPPH\* foi aplicado com modificações descritas por Kim et al. (2002). Avaliou-se a redução da absorvância do radical DPPH\* 100  $\mu\text{M}$  (2,9 mL) dissolvido em solução aquosa de metanol a 80 %. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 515 nm (Hewlett-Packard 8452A) no tempo inicial e após 30 min da adição de cada extrato. A atividade antioxidante do mirtilo, em PF, foi calculada em  $\mu\text{mol.100 g}^{-1}$  de TEAC.

### **Atividade antioxidante (AA) - Método FRAP**

Descrito por Benzie e Strain (1996), com modificações de Arnous et al. (2002), o método FRAP mede a habilidade de antioxidantes reduzirem o complexo férrico  $\text{Fe}^{+3} - 2,4,6\text{-tripiridil-s-triazina} [(\text{Fe}^{+3} - (\text{TPTZ})_2)]^{+3}$  para um complexo ferroso  $[(\text{Fe}^{+2} - (\text{TPTZ})_2)]^{+2}$  intensamente azul em meio ácido. A absorvância foi medida no comprimento de onda de 620 nm (Hewlett-Packard 8452A). O valor do poder redutor, em PF, foi expresso em  $\mu\text{mol.100 g}^{-1}$  de TEAC.

## Poder de inibição da oxidação - Método de co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

O poder de inibição da oxidação foi avaliado pelo método de descoloramento do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). Para o preparo da mistura reativa uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  da solução de  $\beta$ -caroteno ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$  em clorofórmio) foi colocada em um frasco erlenmeyer de 250 mL com 40  $\mu\text{L}$  de ácido linoléico, 1 mL de clorofórmio e 20 mg de Tween 40. Após homogeneização, o clorofórmio foi completamente evaporado sob nitrogênio. Adicionou-se água desionizada (previamente oxigenada durante 30 min) até a formação de uma emulsão límpida e com absorvância entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. Alíquotas de 60  $\mu\text{L}$  dos extratos e do antioxidante sintético BHT ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foram adicionadas a 3 mL da emulsão em cubetas de vidro (10 mm de percurso óptico). Após a leitura inicial em espectrofotômetro (Hewlett-Packard 8452A), a absorvância foi monitorada a cada 15 min, durante 120 min de reação, sendo as cubetas mantidas em banho-maria a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  para acelerar o processo de oxidação. A redução da absorvância foi comparada ao controle (sem antioxidante) e a AA foi calculada em termos de percentual de inibição, relativo ao controle, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left( \frac{A_i - A_f}{C_i - C_f} \times 100 \right) \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

$A_i$  = absorvância inicial da solução de extrato

$A_f$  = absorvância final da solução de extrato

$C_i$  = absorvância inicial da solução controle

$C_f$  = absorvância final da solução controle

### Análise Estatística

As análises descritivas, regressão linear ( $R^2$ ), correlação linear (R), análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram executados no software Statistica® (2004), versão 7.0. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. As médias são representantes da análise de três amostras ( $n= 3$ ) de cada cultivar,

sendo todos os métodos analíticos executados em triplicata. Diferenças a  $p < 0,05$  foram consideradas significativas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Compostos fenólicos totais (FT) e Antocianinas monoméricas totais (AMT)

A Tabela 1 apresenta a concentração de FT das cultivares de mirtilo estudadas. A concentração de compostos fenólicos variou de 274,48 até 694,60 mg EAG.100 g<sup>-1</sup> PF. A cultivar Clímax, proveniente de Barbacena (MG), apresentou a maior concentração de FT. Sellappan, Akoh e Krewer (2002) estudando diferentes cultivares de mirtilo do Estado da Geórgia (EUA) encontraram uma concentração máxima de FT, 34 % superior à nossa com 929,62 mg.100 g<sup>-1</sup> PF, encontrada na cv. Brightblue. Estes mesmos autores encontraram uma concentração mínima de 261,95 mg.100 g<sup>-1</sup> PF, valor próximo ao encontrado por nós para a cv. Bluecrop, com 274,48 mg.100 g<sup>-1</sup> PF. Esta concentração é superior a encontrada por Prior et al. (1998), de 189,80 mg.100 g<sup>-1</sup> PF para a cv. Bluecrop produzida na Carolina do Norte (EUA), e ao mesmo tempo inferior ao encontrado por Kalt et al. (1999) de 386,17 mg.100 g<sup>-1</sup> PF e Giovanelli e Buratti (2009) de 299,00 mg.100 g<sup>-1</sup> PF, avaliando esta mesma cultivar produzida no Canadá e na Itália, respectivamente.

As amostras das cvs. Powderblue, Clímax, Bluebelle e Bluegem coletadas em diferentes locais de produção do Brasil (Tabela 1) apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação à concentração de FT. Estes resultados confirmam o efeito do local de produção sobre a concentração de compostos fenólicos. Similarmente, Connor, Luby e Tong (2002) verificaram influência significativa ( $p < 0,05$ ), em duas safras, do local de cultivo sobre o conteúdo de FT presente em 16 cultivares de mirtilo.

Observa-se na Tabela 1 que, em geral, as cultivares representantes da espécie *Vaccinium ashei* Reade apresentaram maior riqueza em compostos fenólicos que a cv. Bluecrop, única representante da espécie *Vaccinium corymbosum* avaliada. Esta maior riqueza em compostos fenólicos também foi

observada em outros trabalhos que avaliaram cultivares representantes destas duas espécies (PRIOR et al., 1998; MOYER et al., 2002).

**Tabela 1.** Compostos fenólicos totais (FT), antocianinas monoméricas totais (AMT) e relação AMT/FT de cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil

CULTIVAR	FT (mg.100 g <sup>-1</sup> )*	AMT (mg.100 g <sup>-1</sup> )**	AMT/FT***
<i>Vaccinium corymbosum</i> L.			
Bluecrop <sup>b</sup>	274,48 ± 15,83 <sup>G</sup>	40,62 ± 3,17 <sup>G</sup>	0,15
<i>Vaccinium ashei</i> Reade			
Delite <sup>d</sup>	418,67 ± 5,63 <sup>D</sup>	231,47 ± 5,92 <sup>C</sup>	0,55
Powderblue <sup>a</sup>	675,57 ± 10,25 <sup>A</sup>	245,48 ± 19,71 <sup>C</sup>	0,36
Bluegem <sup>a</sup>	336,57 ± 1,92 <sup>F</sup>	265,99 ± 23,95 <sup>B</sup>	0,79
Clímax <sup>a</sup>	288,03 ± 8,10 <sup>G</sup>	240,50 ± 37,51 <sup>C</sup>	0,83
Flórida M <sup>a</sup>	332,96 ± 24,67 <sup>F</sup>	278,76 ± 19,92 <sup>B</sup>	0,84
Woodard <sup>a</sup>	378,55 ± 26,91 <sup>E</sup>	254,89 ± 18,39 <sup>B</sup>	0,67
Bluebelle <sup>d</sup>	339,39 ± 18,28 <sup>F</sup>	238,85 ± 15,56 <sup>C</sup>	0,70
Powderblue <sup>c</sup>	436,69 ± 13,91 <sup>D</sup>	220,29 ± 18,19 <sup>D</sup>	0,50
Briteblue <sup>c</sup>	482,64 ± 14,36 <sup>C</sup>	258,17 ± 30,38 <sup>B</sup>	0,53
Flórida M <sup>c</sup>	340,41 ± 6,98 <sup>F</sup>	69,97 ± 4,82 <sup>F</sup>	0,21
Bluebelle <sup>c</sup>	557,33 ± 18,58 <sup>B</sup>	162,85 ± 14,56 <sup>E</sup>	0,29
Bluegem <sup>c</sup>	542,45 ± 21,36 <sup>B</sup>	186,66 ± 9,61 <sup>E</sup>	0,34
Clímax <sup>e</sup>	694,60 ± 47,39 <sup>A</sup>	234,08 ± 19,69 <sup>C</sup>	0,34
Tifblue <sup>e</sup>	450,62 ± 6,63 <sup>D</sup>	378,31 ± 16,23 <sup>A</sup>	0,84
<b>Média ± DP</b>	<b>448,18 ± 128,63</b>	<b>233,31 ± 67,63</b>	<b>0,56</b>

Valores em peso fresco (PF) de mirtilo expressos como média ± desvio-padrão (n = 3).

\* Fenólicos totais expressos em equivalente a ácido gálico.

\*\* Antocianinas totais expressas em equivalente a cianidina-3-glicosídeo.

AT/FT\*\*\* = antocianinas/fenólicos totais.

<sup>a</sup> Caxias do Sul (RS), <sup>b</sup> Vacaria (RS), <sup>c</sup> Pelotas (RS), <sup>d</sup> Campos do Jordão (SP), <sup>e</sup> Barbacena (MG). Valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença significativa (p < 0,05)

O conteúdo de AMT das cultivares de mirtilo é demonstrado na Tabela 1. A concentração variou de 40,62 a 378,31 mg.100 g<sup>-1</sup> PF encontrada nas cvs. Bluecrop e Tifblue, respectivamente. Com exceção das cvs. Flórida M (Pelotas, RS) e Bluecrop que apresentaram concentração muito inferior e da cv. Tifblue que apresentou uma concentração muito superior às demais cultivares, não há grande variabilidade no conteúdo de AMT entre as cultivares estudadas. Os valores

encontrados de AMT para o mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzido no Brasil são superiores aos apresentados por Sellappan et al. (2002) para cultivares de mirtilo (*Vaccinium corymbosum* e *Vaccinium ashei* Reade) e amora (*Rubus* L.) produzidas na Geórgia (EUA).

As cvs. Flórida M, Bluegem, Powderblue e Bluebelle, cultivadas em diferentes locais, apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a concentração de AMT. Destaca-se a cv. Flórida M proveniente de Caxias do Sul (RS) que apresentou uma concentração aproximadamente 4 vezes superior àquela apresentada pela mesma cultivar produzida em Pelotas (RS).

Na Tabela 1 é mostrada a relação AMT/FT como uma estimativa da representatividade das AMT em relação à concentração de FT presentes na fruta. Conforme pode ser observado, em média, as antocianinas representaram 56 % dos FT presentes nas cultivares da espécie *Vaccinium ashei* Reade avaliadas. Dessa forma, nossos dados confirmam os resultados obtidos por outros autores (MOYER et al., 2002; TARUSCIO et al., 2004; GIOVANELLI e BURATTI, 2009), que demonstram as antocianinas como responsáveis por uma grande proporção dos compostos fenólicos presentes no mirtilo. Estes flavonóides são responsáveis por grande parte da AA apresentada pelo do mirtilo, conforme foi demonstrado por Zheng e Wang (2003) onde as antocianinas presentes representaram 55,4 % dos FT e contribuíram com 56,3 % da atividade antioxidante apresentada pela fruta.

O mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzido no Brasil, apesar das diferenças observadas entre as cultivares, é rico em compostos fenólicos. Esta constatação por ser confirmada pela maior concentração de FT comparada a outras frutas como a maçã, abacate, ameixa, framboesa, morango, banana, amora, uva, cereja, manga, limão, laranja, nectarina, pêsego, pêra e abacaxi (WU et al., 2004; WOLFE et al., 2008).

#### **Atividade antioxidante (AA) – Métodos ABTS, DPPH e FRAP**

A Tabela 2 apresenta os resultados da avaliação da AA das cultivares de mirtilo através dos métodos ABTS, DPPH e FRAP. Estes métodos apresentaram

alta correlação positiva ( $p < 0,05$ ) entre si, sendo ABTS/FRAP ( $R = 0,94$ ), DPPH/FRAP ( $R = 0,86$ ) e ABTS/DPPH ( $R = 0,92$ ). Isto significa que os métodos analíticos empregados apresentaram resposta muito similar e podem ser usados sem distinção para quantificar a AA desta fruta.

**Tabela 2.** Atividade Antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP) de cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil

CULTIVAR	ABTS <sup>1</sup> ( $\mu\text{mol} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ )	DPPH <sup>1</sup> ( $\mu\text{mol} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ )	FRAP <sup>1</sup> ( $\mu\text{mol} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ )
<i>Vaccinium corymbosum</i> L.			
Bluecrop <sup>b</sup>	1253,90 $\pm$ 87,55 <sup>G</sup>	1244,13 $\pm$ 12,49 <sup>F</sup>	699,78 $\pm$ 16,47 <sup>E</sup>
<i>Vaccinium ashei</i> Reade			
Delite <sup>d</sup>	1931,90 $\pm$ 60,30 <sup>C</sup>	1756,11 $\pm$ 60,11 <sup>B</sup>	1194,15 $\pm$ 30,67 <sup>D</sup>
Powderblue <sup>a</sup>	1929,20 $\pm$ 150,15 <sup>C</sup>	1907,97 $\pm$ 154,77 <sup>A</sup>	1318,41 $\pm$ 2,16 <sup>C</sup>
Bluegem <sup>a</sup>	1571,69 $\pm$ 35,10 <sup>E</sup>	1473,58 $\pm$ 31,71 <sup>D</sup>	1044,20 $\pm$ 37,62 <sup>D</sup>
Clímax <sup>a</sup>	1419,66 $\pm$ 27,70 <sup>F</sup>	1227,88 $\pm$ 15,53 <sup>F</sup>	868,36 $\pm$ 10,09 <sup>E</sup>
Flórida M <sup>a</sup>	1420,42 $\pm$ 84,63 <sup>F</sup>	1348,76 $\pm$ 144,05 <sup>E</sup>	1126,72 $\pm$ 82,68 <sup>D</sup>
Woodard <sup>a</sup>	1975,60 $\pm$ 109,73 <sup>C</sup>	1653,50 $\pm$ 94,22 <sup>C</sup>	1285,94 $\pm$ 42,93 <sup>C</sup>
Bluebelle <sup>d</sup>	1678,12 $\pm$ 94,27 <sup>D</sup>	1478,40 $\pm$ 128,47 <sup>D</sup>	1271,48 $\pm$ 106,67 <sup>C</sup>
Powderblue <sup>c</sup>	2293,20 $\pm$ 150,46 <sup>AB</sup>	1935,84 $\pm$ 47,91 <sup>A</sup>	1530,77 $\pm$ 149,59 <sup>B</sup>
Briteblue <sup>c</sup>	2185,00 $\pm$ 97,93 <sup>B</sup>	2055,06 $\pm$ 134,12 <sup>A</sup>	1429,67 $\pm$ 42,61 <sup>B</sup>
Flórida M <sup>c</sup>	1238,50 $\pm$ 48,45 <sup>G</sup>	1014,20 $\pm$ 81,56 <sup>G</sup>	732,79 $\pm$ 40,63 <sup>E</sup>
Bluebelle <sup>c</sup>	2438,90 $\pm$ 133,90 <sup>A</sup>	1983,00 $\pm$ 121,40 <sup>A</sup>	1544,64 $\pm$ 126,38 <sup>B</sup>
Bluegem <sup>c</sup>	2445,96 $\pm$ 227,75 <sup>A</sup>	1873,19 $\pm$ 55,8 <sup>B</sup>	1740,25 $\pm$ 161,66 <sup>A</sup>
Clímax <sup>e</sup>	1951,61 $\pm$ 22,11 <sup>C</sup>	1917,02 $\pm$ 61,91 <sup>A</sup>	1262,03 $\pm$ 22,20 <sup>C</sup>
Tifblue <sup>e</sup>	2028,80 $\pm$ 128,01 <sup>C</sup>	1727,95 $\pm$ 69,12 <sup>B</sup>	1163,95 $\pm$ 35,62 <sup>D</sup>
<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	<b>1893,47 <math>\pm</math> 382,89</b>	<b>1668,03 <math>\pm</math> 315,12</b>	<b>1250,95 <math>\pm</math> 266,90</b>

Valores em peso fresco (PF) de mirtilo expressos como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 3$ ).

<sup>1</sup> Expresso em  $\mu\text{mol} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de TEAC (Atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

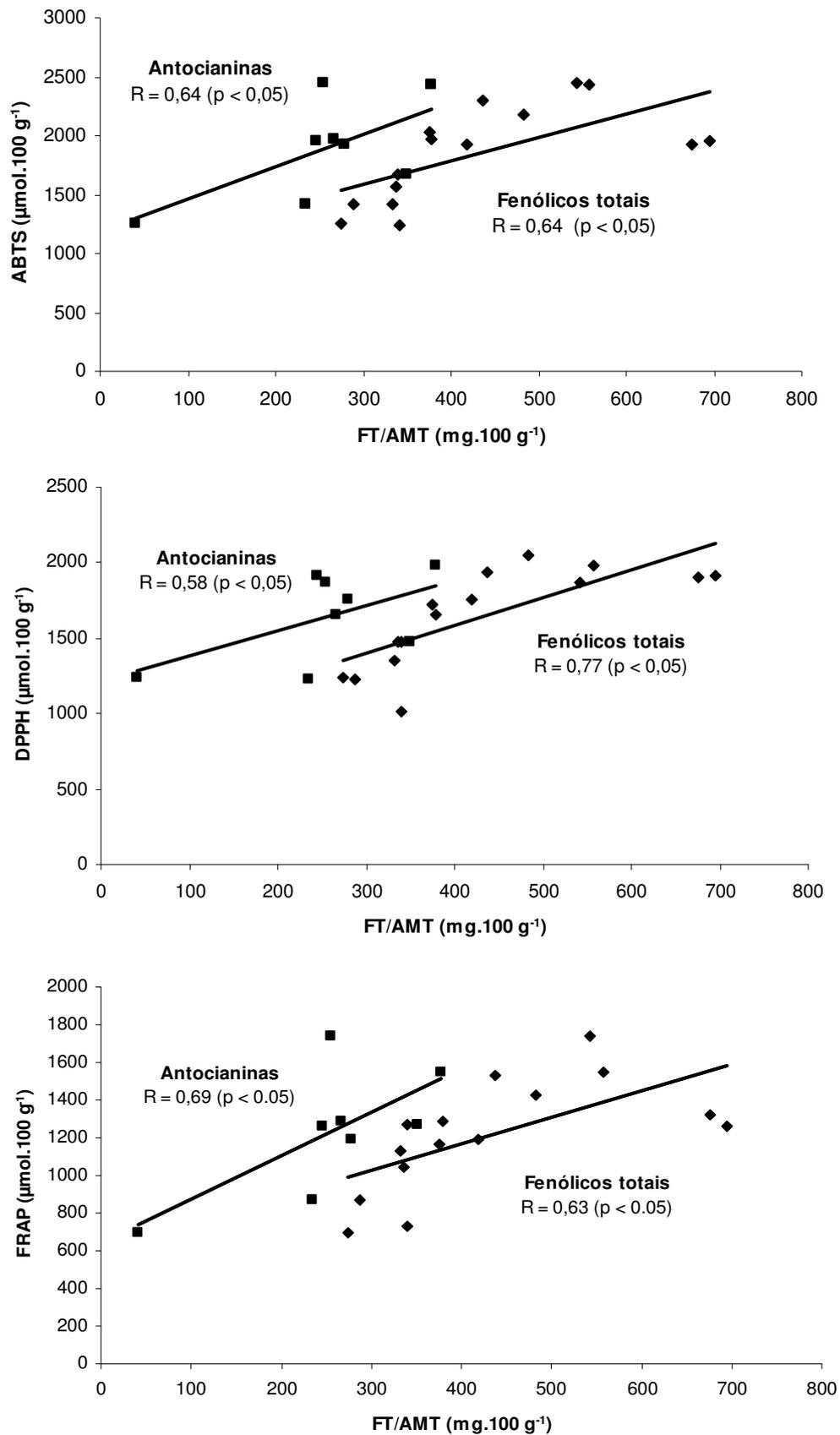
<sup>a</sup> Caxias do Sul, <sup>b</sup> Vacaria, <sup>c</sup> Pelotas, <sup>d</sup> Campos do Jordão, <sup>e</sup> Barbacena.

Valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Foi encontrada uma correlação moderada ( $p < 0,05$ ) entre a AA medida pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP e a concentração de FT e AMT nas cultivares estudadas (Figura 1). Esta correlação moderada pode ser resultado da presença de compostos que apresentam AA, mas que não são compostos fenólicos ou a presença de compostos fenólicos com maior eficiência que outros

(LIEN et al., 1999; NATELLA et al., 1999; GIOVANELLI e BURATTI, 2009). Além disso, pode ser resultado de efeitos antagônicos ou sinérgicos entre os compostos fenólicos presentes na matriz. Assim, a concentração de FT isoladamente não permite uma indicação precisa da AA do mirtilo. Similarmente, Srivastava et al. (2007) encontraram uma correlação moderada entre a concentração de FT e AMT e a AA apresentada pelo mirtilo. Ao mesmo tempo, estes dados não concordam com os trabalhos de Prior et al. (1998), Kalt et al. (1999), Moyer et al. (2002), Taruscio et al. (2004) e Giovanelli e Buratti (2009) que encontraram uma alta correlação positiva entre FT e AMT e a AA apresentada pelo mirtilo.

A AA medida pela aplicação do método ABTS mostrou grande amplitude entre as cultivares de mirtilo estudadas, com variação de, respectivamente, 1238,48 a 2445,96  $\mu\text{mol TEAC.100 g}^{-1}$  PF, apresentada para as cvs. Flórida M e Bluebelle, ambas de Pelotas (RS). Sellappan et al. (2002), avaliando a AA pelo mesmo método analítico, encontraram uma amplitude ainda maior, com os valores variando de 811 a 3829  $\mu\text{mol TEAC.100 g}^{-1}$  PF de mirtilo. Esta grande amplitude também foi observada por Prior et al. (1998) e Moyer et al. (2002) avaliando a AA pelo método ORAC. A AA medida pelo método ABTS para as cvs. Powderblue, Clímax, Bluegem, Flórida M e Bluebelle, produzidas em dois locais diferentes, apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Portanto, assim como para o teor de FT, as diferenças observadas nestes valores confirmam o efeito do local de produção sobre a AA e estão de acordo com aqueles apresentados por Connor, Luby e Tong (2002) onde foram avaliadas 16 cultivares de mirtilo e encontradas diferenças entre a AA de amostras produzidas em três regiões dos EUA (Michigan, Minesota e Oregon).



**Figura 1.** Relação entre a concentração de fenólicos totais e de antocianinas monoméricas totais e a atividade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP) em cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil.

A avaliação da AA pelo método DPPH e FRAP também apresentou grande amplitude entre as cultivares estudadas, com valores variando de 1014,20 a 2055,06 e 699,78 a 1740,25  $\mu\text{mol TEAC.100 g}^{-1}$  PF, respectivamente. As cvs. Briteblue, Powderblue, Clímax e Bluebelle (Pelotas, RS) e Clímax (Barbacena, MG) apresentaram os maiores valores de AA pelo método DPPH, sendo que eles não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) entre si. Pelo método FRAP a cv. Bluegem (Pelotas, RS) apresentou isoladamente a maior AA. Assim como no método ABTS, algumas cultivares produzidas em locais diferentes do Brasil apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Conforme pode ser observado na Tabela 2, da mesma forma que para FT e AMT, as cultivares representantes da espécie *Vaccinium ashei* Reade apresentaram, em geral, AA superior àquela representante da espécie *Vaccinium corymbosum*, a cv. Bluecrop. Moyer et al. (2002), avaliando a cultivar Bluegem como única representante da espécie *Vaccinium ashei* Reade, encontraram valores de AA aproximadamente duas vezes superior ao encontrado em amostras ( $n = 7$ ) da espécie *Vaccinium corymbosum*. Já Prior et al. (1998) encontraram AA equivalente para cultivares representantes destas duas espécies.

Em geral, os valores de AA deste trabalho são similares aos apresentados por outros autores para cultivares e espécies de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas na Espanha (GARCIA-ALONSO et al., 2004), e ligeiramente inferiores àqueles da Itália (GIOVANELLI e BURATTI, 2009) e EUA (MOYER et al., 2002; SELLAPPAN, AKOH e KREWER, 2002; TARUSCIO et al., 2004). Não é surpresa que a AA do mirtilo tenha demonstrado superioridade em relação a outras frutas (GARCÍA-ALONSO et al., 2004), considerando a elevada AA relatada anteriormente por alguns autores.

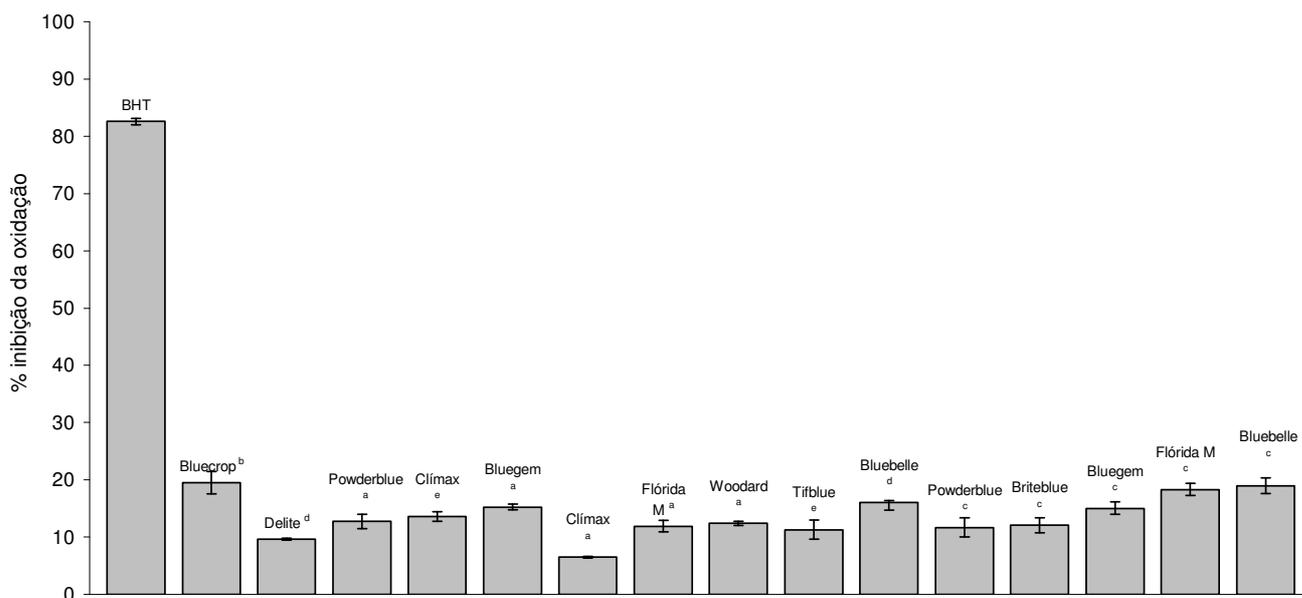
### **Atividade antioxidante (AA) – Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico**

Na Figura 2 é apresentada a AA das cultivares de mirtilo no método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Todas as cultivares apresentaram AA muito inferior à

apresentada pelo BHT, usado como controle positivo. A cv. Bluecrop, representante da espécie *Vaccinium corymbosum*, apresentou a maior AA neste sistema emulsionado, com o valor de 19,49 % de inibição da oxidação. Em seguida aparecem as cultivares Flórida M e Bluebelle, ambas de Pelotas (RS), com os valores 18,32 e 18,96 % de inibição da oxidação, respectivamente. Estas duas cultivares não apresentam diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ). Os valores de AA são similares aos encontrados por Melo et al. (2008) para o abacaxi, caju, laranja cravo, laranja pêra, mamão formosa, mamão Havaí, manga, melancia e melão, e inferiores aos da goiaba e pinha. Neste mesmo trabalho, as frutas foram classificadas como de atividade antioxidante moderada e fraca quando apresentavam inibição da oxidação superior ou inferior a 50 %, respectivamente. Considerando este critério, todas as cultivares de mirtilo apresentam baixa atividade antioxidante neste sistema emulsionado, assim como a maioria das frutas acima citadas.

A AA apresentada pelos extratos de mirtilo no método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico foi bastante diferente daquela medida pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP. Nestes três métodos a cv. Bluecrop apresentou-se como uma das cultivares com menor AA, sendo, entretanto, aquela que apresentou a maior capacidade de inibir a oxidação no método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Similarmente, Melo et al. (2008) observaram que as frutas que apresentavam uma elevada AA no método DPPH apresentavam as menores AAs pelo método do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Uma possível explicação para estas diferenças é o fato dos métodos ABTS, DPPH e FRAP não sofrerem a influência de substâncias pró-oxidantes, diferentemente do método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Estas diferenças na resposta dos métodos evidenciam a relevância da aplicação de mais de um método analítico, com princípios diferentes, quando há o objetivo de avaliar a AA de uma matriz alimentar ou mesmo de um composto puro.

As diferenças tanto na AA como na concentração de FT e AMT encontradas em nosso trabalho, e aquelas de outros autores, podem ser atribuídas não somente a diferenças de cultivar e local de produção, mas também a diferenças no método de extração (solvente e tempo) e até a diferentes metodologias aplicadas para avaliação de FT, AMT e AA do mirtilo.



**Figura 2.** Capacidade de inibição da oxidação (%) de cultivares de mirtilo (*Vaccinium sp.*) produzidas no Brasil no método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão.

## CONCLUSÃO

Os resultados confirmam o mirtilo (*Vaccinium sp.*) produzido no Brasil como fonte de compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante. Demonstram ainda que existem diferentes níveis de concentrações de compostos fenólicos e atividade antioxidante de acordo com a cultivar e o local de produção do mirtilo.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro e à empresa Italbraz®, Probst e Fazenda Saint Clair pela doação das amostras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOUS, A.; MAKRIS, D.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 655 – 665, 2002.

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.

CONNOR, A. M.; LUBY, J. J.; TONG, C. B. S. Genotype and enviromental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 127, p. 89 – 97, 2002.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH'. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446 – 452, 2006.

DUFFY, K. B.; SPANGLER, E. L.; DEVAN, B. D.; GUO, Z.; BOWKER, J. L.; JANAS, A. M.; HAGEPANOS, A.; MINOR, R. K.; DECABO, R.; MOUTON, P. R.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A.; INGRAM, D. K. A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats. **Neurobiology of Aging**, v. 29, p. 1680 – 1689, 2007.

DUTHIE, G.; CROZIER, A. Plant-derived phenolic antioxidants. **Current Opinion in Lipidology**, v. 11, p. 43 – 47, 2000.

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

GERMAN, J. B.; WALZEM, R. L. The health benefits of wine. **Annual Review of Nutrition**, v. 20, p. 561 – 593, 2000.

GIOVANELLI, G.; BURATTI, S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. **Food Chemistry**, v. 112, p. 903 – 908, 2009.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, unit F1.3, p 1 – 13, 2001.

KALT, W.; FORNEY, C. F; MARTIN, A.; PRIOR, R. L. Antioxidant capacity, vitamin c, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 4638 – 4644, 1999.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 36, p. 703 – 725, 2001.

KIM, D-O.; LEE, K.W.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, 3713 – 3717, 2002.

KUSKOSKI, M. E.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutas tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1283 – 1287, 2006.

LIEN, E. J.; REN, S.; BUI, H., WANG, R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolics antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 285 – 294, 1999.

LU, T.; FINKEL, T. Free radicals and senescence. **Experimental Cell Research**, v. 314, p. 1918 – 1922, 2008.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 45, 594 – 598, 1968.

MATEOS, R.; BRAVO, L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). **Journal of Separation Science**, v. 2, p. 175 – 191, 2007.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 193 – 201, 2008

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MOYER, R. A.; HUMMER, K. E.; FINN, C. E.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 519 – 525, 2002.

NATELLA, F.; NARDINI, M.; FELICE, M. D.; SCACCINI, C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1453 – 1459, 1999.

POTTER, R. M.; DOUGHERTY, M. P.; HALTEMAN, W. A.; CAMIRE, M. E. Characteristics of wild Blueberry–Soy Beverages. **LWT**, v. 40, p. 807 – 814, 2007.

PRIOR, R. L.; CAO, G. H.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; McEWEN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C. M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, 2686 – 2693, 1998.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231 – 1237, 1999.

SANTOS, A. M. Situação e perspectiva do mirtilo no Brasil. Embrapa Clima Temperado Pelotas, RS. **Série Documentos**, n. 134, p. 282 – 285, 2004.

SEERAM, N. P. Berry fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 627 – 629, 2008.

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.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144 – 158, 1965.

SRIVASTAVA, A.; AKOH, C. C.; YI, W.; FISCHER, J. KREWER, G. Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2705 – 2713, 2007.

STRIK, B. Blueberry: An expanding world berry crop. **Horticultural Sciences Focus**, v. 45, p. 7 – 12, 2005.

WOLFE, K. L.; KANG, X.; HE, X.; DONG, M.; ZHANG, Q.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8418 – 8426, 2008.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods

in the united states. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4026 – 4037, 2004.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 381 – 406, 2001.

### **CAPÍTULO 3**

#### **ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES NÃO-ANTOCIÂNICOS EM CULTIVARES DE MIRTILO (*Vaccinium* sp.) PRODUZIDAS NO BRASIL**

## ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES NÃO-ANTOCIÂNICOS EM CULTIVARES DE MIRTILO (*Vaccinium* sp.) PRODUZIDAS NO BRASIL

Eliseu RODRIGUES<sup>1\*</sup>, Ismael Ivan ROCKENBACH<sup>1</sup>, Naira POERNER<sup>2</sup>, Luciano Valdemiro GONZAGA<sup>1</sup>, Paulo Gustavo CELSO<sup>3</sup>, Roseane FETT<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO, Porto Alegre, RS, Brasil.

### RESUMO

A composição dos ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos foi determinada em 10 cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil. As amostras foram submetidas a processo de extração e hidrólise, sendo a identificação e quantificação dos compostos conduzida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foram encontrados 7 compostos fenólicos (5 ácidos fenólicos e 2 flavonóides não-antociânicos). Os ácidos protocatecuico e clorogênico foram encontrados como compostos fenólicos majoritários em concentrações variando de, respectivamente, 39,62 a 110,86 e 18,18 a 33,16 mg.100 g<sup>-1</sup> em peso fresco (PF). Os resultados evidenciaram que as cultivares de mirtilo produzidas no Brasil apresentam perfil qualitativo similar de ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos, porém possuem diferentes níveis de concentração destes compostos.

**Palavras chave.** Mirtilo, cultivares, ácidos fenólicos, flavonóides não-antociânicos.

### ABSTRACT

The composition of phenolic acids and non-anthocyanic flavonoids in 10 cultivars of blueberry (*Vaccinium* sp.) grown in Brazil was determined. Samples were analyzed after extraction and hydrolysis process, with the identification and quantification carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC). Protocatechuic and chlorogenic acids were found as major phenolic compounds, with concentrations ranging from, respectively, 39.62 to 110.86 and 18.18 to 33.16 mg.100 g<sup>-1</sup> in fresh weight (FW). Results showed that blueberry cultivars grown in Brazil present similar phenolic acids and non-anthocyanic flavonoids qualitative profile, presenting, however, different concentration levels of these compounds in their composition.

**Keywords.** blueberry, cultivars, phenolic acids, non-anthocyanic flavonoids.

## INTRODUÇÃO

Diversos estudos epidemiológicos e em laboratório mostram a relação inversa entre uma dieta rica em frutas e vegetais e o risco de doenças cardiovasculares, cognitivas e certos tipos de câncer (GOODWIN e BRODWICK, 1995; YANG et al., 2001; KAUR e KAPOOR, 2001; GARCÍA-ALONSO et al., 2004; VECCHIA, 2004; DAI et al. 2006; TRICHOPOULOU et al., 2008; NÖ THLINGS et al., 2008). O principal benefício desta dieta parece ser o aumento do consumo de compostos antioxidantes, dos quais os compostos fenólicos parecem ser os principais (AMES, SHIGENA e HAGEN, 1993; WANG, CAO e PRIOR, 1996). A ação destes compostos está relacionada à atenuação de eventos oxidativos e à inibição ou ativação de sistemas enzimáticos que podem contribuir para o desenvolvimento dessas doenças (HALLIWELL et al., 1995; PIETTA, 2000; SEERAM e NAIR, 2002).

O mirtilo (*Vaccinium* sp.) é uma pequena fruta originária da Europa e América do Norte. Apresenta elevada concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante, verificada em vários trabalhos e por diferentes metodologias (KALT et al., 1999; MOYER et al., 2002; SELLAPPAN, AKOH e KREWER, 2002; GARCIA-ALONSO et al., 2004; WU et al., 2004). Ácidos fenólicos e flavonóides são os compostos fenólicos majoritários presentes nesta fruta (HAKKINEN et al., 1999; ZHENG e WANG, 2003; GIOVANELLI e BURATTI, 2009).

A presença de um grande número de ácidos fenólicos no mirtilo já foi relatada na literatura (TARUSCIO et al., 2004; ZADERNOWSKI, NACZK e NESTEROWICZ, 2005). Estes compostos caracterizam-se por um anel benzênico, um grupamento carboxílico, e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula (NATELLA et al., 1999). Podem ser classificados como derivados do ácido benzóico ou do ácido cinâmico. A sua atividade antioxidante depende do número e posição de grupos hidroxila em relação ao grupo funcional carboxila. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos aumenta com o aumento do grau de hidroxilação, como é o caso do trihidroxilado ácido gálico, que apresenta elevada atividade antioxidante. Em contrapartida, a substituição dos grupos hidroxila nas

posições 3 e 5 por grupos metoxila, como no caso do ácido siríngico, reduz a atividade. Os ácidos cinâmicos apresentam maior atividade antioxidante que os ácidos benzóicos correspondentes. Isso pode ser explicado pelo grupo  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ , o qual garante maior habilidade de doar íons  $\text{H}^+$  e estabilizar radicais que o grupo  $\text{COOH}$  (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

Os flavonóides constituem um enorme grupo de fenólicos de plantas, representando mais da metade dos compostos fenólicos que ocorrem naturalmente (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006). Diversos flavonóides foram encontrados no mirtilo, sendo os principais a catequina, a quercetina, miricetina e kaempferol (SELLAPPAN, AKOH e KREWER, 2002; GARCIA-ALONSO et al., 2004). Caracterizam-se estruturalmente por um esqueleto carbônico  $\text{C}_6-\text{C}_3-\text{C}_6$ , no qual os três carbonos entre os grupos fenil são ciclizados com oxigênio. Flavanóis, flavonóis e antocianinas fazem parte deste grupo. Todos estes compostos apresentam elevada atividade antioxidante, que depende principalmente do número e posição dos grupos hidroxila presentes em sua estrutura (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996).

A composição e o conteúdo de compostos fenólicos do mirtilo (*Vaccinium* sp.) são influenciados por fatores como a espécie, a cultivar, a época de crescimento, as condições ambientais, o tipo de solo e localização geográfica de produção (SELLAPPAN, AKOH e KREWER, 2002; CONNOR, LUBY e TONG, 2002; MOYER et al., 2002). Isto justifica os vários trabalhos que avaliam a composição fenólica desta fruta em diferentes países ou regiões de um mesmo país.

O Brasil é um produtor ainda recente de mirtilo, sendo que sua produção está concentrada na região Sul e Sudeste, totalizando uma área de aproximadamente 35 ha. Considerando que estas regiões produtoras apresentam características edafoclimáticas próprias e que não há trabalhos na literatura sobre o mirtilo produzido no país, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de elucidar o perfil qualitativo e quantitativo de ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos presentes em 10 cultivares de mirtilo produzidas no Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Padrões e solventes

Os padrões de ácidos fenólicos (ácidos gálico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido elágico, ácido clorogênico, ácido siríngico, ácido protocatecuico e ácido vanílico) e os flavonóides ((+)-catequina e quercetina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha) e Fluka Chemie AG (Buchs, Suíça). Metanol gradiente Lichrosolv para CLAE e ácido fórmico (98-100 %) PA foram adquiridos da Merck (Darmstad, Alemanha). A água utilizada foi obtida de um sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> com resistividade de 18 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup> (Millipore, Bedford, EUA).

### Amostragem

As amostras de mirtilo foram coletadas diretamente nos produtores (safra 2008) no Estado do Rio Grande do Sul – RS (Região Sul), nos municípios de Pelotas, Caxias do Sul e Vacaria; Estado de São Paulo – SP (Região Sudeste), município de Campos do Jordão; Estado de Minas Gerais – MG (Região Sudeste), município de Barbacena. Foram utilizadas no trabalho as cultivares: Bluecrop (*Vaccinium corymbosum*); Delite, Woodard, Clímax, Bluegem, Flórida M, Powderblue, Briteblue, Bluebelle, Tifblue (*Vaccinium ashei* Reade). A coleta das amostras foi efetuada de modo aleatório, resultando em 3 (três) amostras de aproximadamente 500 g de cada cultivar. Para as cvs. Clímax, Bluegem, Flórida M, Powderblue e Bluebelle foram coletadas amostras provenientes de dois locais diferentes de produção. As amostras foram transportadas para o laboratório a 5,0  $\pm$  1,0 °C, onde foram separadas em embalagens plásticas em porções de aproximadamente 100 g. Estas embalagens foram desoxigenadas com fluxo de nitrogênio por 5 min, sendo então congeladas e armazenadas a - 18,0  $\pm$  0,5 °C até o momento das análises. Cuidado especial foi tomado na seleção das frutas para evitar amostras com danos, não-maduras ou muito maduras.

### Métodos

## Preparo da amostra

As amostras de mirtilo foram submetidas a processo de extração e hidrólise de acordo com procedimento descrito por Sellappan, Akoh e Krewer (2002). Uma massa de 10,00 g de amostra foi extraída e hidrolisada com 50 mL de metanol (1,2 M HCl). O frasco para hidrólise foi coberto com papel alumínio e desoxigenado através da injeção de nitrogênio por 5 min. A amostra desoxigenada foi colocada sob refluxo a 95 °C por 2 h para a hidrólise dos glicosídeos até agliconas e para romper ligações éster dos ácidos fenólicos conjugados. A amostra hidrolisada foi resfriada na ausência de luz, sendo posteriormente centrifugada a 2000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore® PVDF (33 mm) de 0,45 µm. Uma alíquota de 20 µL do filtrado foi injetada no CLAE para análise.

## Identificação e quantificação por CLAE

As análises foram feitas em um cromatógrafo líquido Shimadzu LC-20A Prominence (Kyoto, Japão), equipado com o software LC-Solution, uma bomba LC-20AT, um auto-amostrador SIL-20AC, um detector de arranjo de diodos SPD-M20A, um desgaseificador DGU-20A3 e um forno para coluna CTO-20A. A separação dos compostos foi conduzida à temperatura ambiente ( $20,0 \pm 1,0$  °C) em uma coluna Phenomenex, Prodigy 5-µm, ODS-2, RP-18 (250 x 4,6 mm). Foi usada uma pré-coluna Vertisep 5-µm C18 (4,6 x 10 mm). A programação do gradiente da fase móvel (A) água/metanol (70:30 v.v<sup>-1</sup>) com 1 % de ácido fórmico, (B) metanol, (C) água com 1 % de ácido fórmico é apresentada na Tabela 1. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada através da comparação do espectro e o tempo de retenção de padrões puros com aqueles obtidos nas amostras. Os espectros foram obtidos no intervalo de comprimento de onda de 220 a 450 nm. A quantificação foi feita por calibração externa, com as curvas analíticas dos padrões variando de 2 – 160 mg.L<sup>-1</sup>. Os padrões foram preparados em metanol. Todas as curvas usadas na quantificação apresentaram coeficiente de regressão (R<sup>2</sup>) superior a 0,99.

**Tabela 1.** Programa do gradiente de eluição

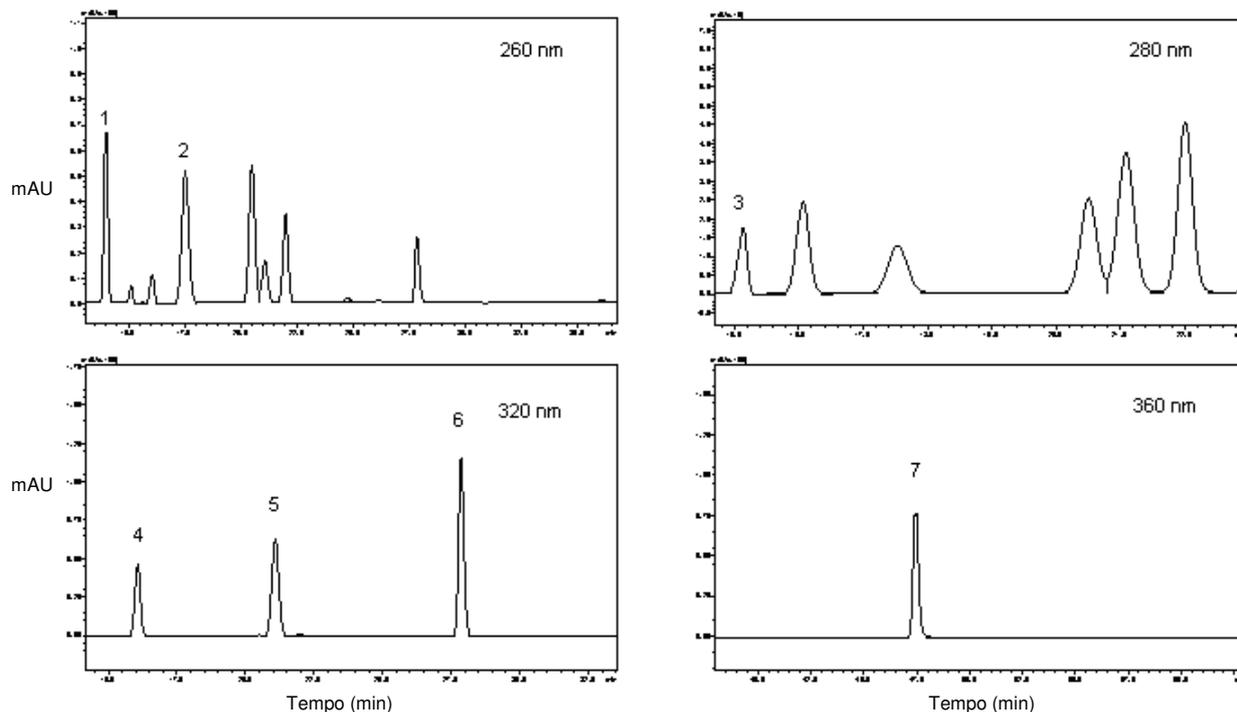
Tempo (min)	<b>A</b>			Fluxo (mL.min <sup>-1</sup> )
	Água/metanol (70:30) com 1 % de ácido fórmico (%)	<b>B</b> Metanol (%)	<b>C</b> Água com ácido fórmico (1%)	
0,00	0,00	0,00	100,00	1,3
5,00	0,00	0,00	100,00	1,3
5,01	50,00	0,00	50,00	1,3
10,00	85,00	15,00	0,00	1,0
10,01	50,00	5,00	45,00	1,0
20,00	85,00	15,00	0,00	1,0
25,00	85,00	15,00	0,00	1,0
60,00	45,00	55,00	0,00	1,0
60,01	0,00	100,00	0,00	1,0
65,00	0,00	100,00	0,00	1,0
65,01	50,00	0,00	50,00	1,0
75,00	50,00	0,00	50,00	1,0

### **Análise Estatística**

As análises foram realizadas em duplicata e os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. A ANOVA e o teste de Tukey foram usados para a comparação das médias de concentração. Diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas significativas. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software Statistica<sup>®</sup> (2004), versão 7.0.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todas as cultivares apresentaram um perfil fenólico qualitativo similar, sendo identificados e quantificados 7 compostos fenólicos (5 ácidos fenólicos e 2 flavonóides não-antociânicos). Na Figura 1 está apresentado um cromatograma típico da cv. Powderblue (Caxias do Sul, RS) nos quatro comprimentos de onda (260, 280, 320 e 360 nm) usados para identificação e quantificação. O emprego destes quatro comprimentos de onda possibilitou a diminuição da interferência de compostos desconhecidos presentes nas amostras.



**Figura 1.** Ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos da cv. Powderblue nos quatro comprimentos de onda (260, 280, 320 e 360 nm) usados para identificação e quantificação. Compostos: (1) ácido protocatecuico; (2) ácido p-hidroxibenzóico; (3) catequina; (4) ácido clorogênico; (5) ácido caféico; (6) ácido ferúlico; (7) quercetina.

A concentração dos ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos encontrados nas cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) está apresentada na Tabela 2 e 3. Conforme pode ser observado, os ácidos vanílico, siríngico, elágico e gálico não foram encontrados nas cultivares produzidas no Brasil. Kader et al. (1996) encontraram os ácidos siríngico e vanílico na cv. Coville produzida na França. Similarmente, estes dois ácidos fenólicos foram encontrados por Zadernowski, Nacz e Nesterowicz (2005) através da CG/EM. Os resultados para o ácido gálico também não concordam com os da literatura, visto que a grande maioria dos trabalhos relata concentrações razoáveis deste ácido em diversas espécies e cultivares de mirtilo (SELLAPPAN et al., 2002; ZADERNOWSKI, NACZK e NESTEROWICZ, 2005; SRIVASTAVA et al., 2007). Para o ácido elágico os resultados estão de acordo com Sellappan et al. (2002), visto que para as cultivares comuns ao nosso trabalho, também não foi detectado este ácido. Já Srivastava et al. (2007) avaliaram as cvs. Tifblue e Powderblue, e encontraram concentrações de ácido elágico de 11,0 e 36,0 mg.100 g<sup>-1</sup> PF, respectivamente.

**Tabela 2.** Teores de ácidos fenólicos em cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil

Cultivar	mg.100 g <sup>-1</sup> PF									
	Ácido gálico	Ác. clorogênico	Ác. p-hidroxibenzóico	Ác. vanílico	Ác. elágico	Ác. Protocatecuico	Ác. siríngico	Ác. Caféico	Ác. Ferúlico	Ácidos Fenólicos Totais
<i>Vaccinium corymbosum</i>										
Bluecrop <sup>b</sup>	Nd	18,18 ± 0,00	2,75 ± 0,06	Nd	Nd	40,42 ± 0,36	Nd	1,75 ± 0,03	2,28 ± 0,06	<b>65,38</b>
<i>Vaccinium ashei</i> Reade										
Delite <sup>d</sup>	Nd	27,45 ± 1,67	2,19 ± 0,06	Nd	Nd	49,13 ± 2,10	Nd	3,43 ± 0,03	1,22 ± 0,04	83,42
Powderblue <sup>a</sup>	Nd	33,16 ± 0,03	4,55 ± 0,03	Nd	Nd	110,86 ± 0,04	Nd	2,92 ± 0,00	3,63 ± 0,06	<b>155,12</b>
Bluegem <sup>a</sup>	Nd	22,09 ± 0,14	3,36 ± 0,23	Nd	Nd	46,14 ± 0,76	Nd	1,92 ± 0,58	0,92 ± 0,19	74,43
Clímax <sup>a</sup>	Nd	21,67 ± 0,12	3,44 ± 0,14	Nd	Nd	46,82 ± 0,10	Nd	1,97 ± 0,11	2,34 ± 0,28	76,24
Flórida M <sup>a</sup>	Nd	25,89 ± 0,12	3,49 ± 0,24	Nd	Nd	53,97 ± 1,86	Nd	2,74 ± 0,10	2,10 ± 0,30	88,19
Woodard <sup>a</sup>	Nd	27,39 ± 0,24	3,74 ± 0,06	Nd	Nd	52,13 ± 0,13	Nd	3,75 ± 0,02	2,85 ± 0,09	89,86
Bluebelle <sup>d</sup>	Nd	23,74 ± 1,30	1,85 ± 0,06	Nd	Nd	44,69 ± 1,54	Nd	3,67 ± 0,26	1,22 ± 0,04	75,17
Powderblue <sup>c</sup>	Nd	27,02 ± 2,10	2,18 ± 0,12	Nd	Nd	44,20 ± 1,72	Nd	4,75 ± 0,12	1,28 ± 0,06	79,43
Briteblue <sup>c</sup>	Nd	31,89 ± 1,90	1,99 ± 0,04	Nd	Nd	58,13 ± 0,13	Nd	5,21 ± 0,20	1,40 ± 0,16	98,62
Flórida M <sup>c</sup>	Nd	27,65 ± 0,95	2,19 ± 0,08	Nd	Nd	61,28 ± 3,72	Nd	3,08 ± 0,21	3,06 ± 0,02	97,26
Bluebelle <sup>c</sup>	Nd	32,77 ± 0,07	2,03 ± 0,11	Nd	Nd	54,58 ± 0,02	Nd	5,60 ± 0,06	0,95 ± 0,02	95,93
Bluegem <sup>c</sup>	Nd	21,38 ± 0,00	1,61 ± 0,07	Nd	Nd	39,62 ± 0,26	Nd	3,16 ± 0,01	1,12 ± 0,04	66,89
Clímax <sup>e</sup>	Nd	25,41 ± 0,11	2,30 ± 0,05	Nd	Nd	54,16 ± 0,79	Nd	3,19 ± 0,03	0,85 ± 0,19	85,91
Tifblue <sup>e</sup>	Nd	25,51 ± 0,11	2,33 ± 0,02	Nd	Nd	49,17 ± 1,67	Nd	2,77 ± 0,20	2,26 ± 0,26	82,04
<b>Média ± DP</b>	<b>0</b>	<b>26,08 ± 4,32</b>	<b>2,67 ± 0,85</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>53,69 ± 16,99</b>	<b>0</b>	<b>3,32 ± 1,14</b>	<b>1,83 ± 0,88</b>	<b>-</b>

Valores apresentados como média ± desvio-padrão (n = 3) em peso fresco (PF). Nd: não detectado.

<sup>a</sup>Caxias do Sul (RS), <sup>b</sup>Vacaria (RS), <sup>c</sup>Pelotas (RS), <sup>d</sup>Campos do Jordão (SP), <sup>e</sup>Barbacena (MG).

**Tabela 3.** Teores de flavonóides não-antociânicos em cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil

Cultivar	mg.100 g <sup>-1</sup> PF	
	Catequina	Quercetina
	<i>Vaccinium corymbosum</i>	
Bluecrop <sup>b</sup>	2,74 ± 0,70	3,99 ± 0,22
	<i>Vaccinium ashei</i> Reade	
Delite <sup>d</sup>	4,19 ± 0,928	1,40 ± 0,13
Powderblue <sup>a</sup>	16,60 ± 0,50	2,57 ± 1,01
Bluegem <sup>a</sup>	4,69 ± 0,48	3,61 ± 0,22
Clímax <sup>a</sup>	3,31 ± 0,36	4,51 ± 0,21
Flórida M <sup>a</sup>	3,87 ± 0,17	2,02 ± 0,06
Woodard <sup>a</sup>	3,57 ± 0,36	4,73 ± 0,14
Bluebelle <sup>d</sup>	2,35 ± 0,08	2,64 ± 0,05
Powderblue <sup>c</sup>	3,20 ± 0,08	5,19 ± 0,20
Briteblue <sup>c</sup>	4,01 ± 0,06	3,51 ± 0,19
Flórida M <sup>c</sup>	5,36 ± 0,49	2,34 ± 0,54
Bluebelle <sup>c</sup>	4,17 ± 0,03	7,04 ± 0,26
Bluegem <sup>c</sup>	2,98 ± 0,23	7,37 ± 0,23
Clímax <sup>e</sup>	4,52 ± 1,60	1,59 ± 0,14
Tifblue <sup>e</sup>	5,60 ± 0,12	3,74 ± 0,51
<b>Média ± DP</b>	<b>4,74 ± 3,40</b>	<b>3,75 ± 1,80</b>

Valores apresentados como média ± desvio-padrão (n = 3) em peso fresco (PF).

<sup>a</sup> Caxias do Sul (RS), <sup>b</sup> Vacaria (RS), <sup>c</sup> Pelotas (RS), <sup>d</sup> Campos do Jordão (SP), <sup>e</sup> Barbacena (MG).

A concentração total de ácidos fenólicos variou de 65,38 a 155,12 mg.100 g<sup>-1</sup> PF, para as cultivares Bluecrop e Powderblue (Caxias do Sul, RS), respectivamente. Foram encontrados cinco ácidos fenólicos. Similarmente, Sellappan et al. (2002) e Häkkinen et al. (1999) identificaram, respectivamente, cinco e quatro ácidos fenólicos. Dentre os ácidos fenólicos, o ácido protocatecuico (3,4-dihidroxibenzóico) foi encontrado em maior concentração, com um valor médio de 53,69 mg.100 g<sup>-1</sup> PF. Este resultado não concorda com trabalhos anteriores, onde este ácido é relatado como presente em baixa concentração ou mesmo como ausente no mirtilo (SELLAPPAN et al., 2002; ZHENG e WANG et al., 2003). Taruscio et al. (2004) apresentaram o ácido clorogênico como o principal ácido fenólico das cultivares Bluecrop, Blueajey e Jersey (*Vaccinium corymbosum*). Enquanto isso, Häkkinen et al. (1999) apresentaram o ácido caféico como o ácido fenólico majoritário. Zadernowski, Naczki e Nesterowicz (2005) encontraram os ácidos

hidroxicaféico, m- e p-cumárico, salicílico e 3,4-dimetoxicinâmico como majoritários no mirtilo.

A cv. Powderblue (Caxias do Sul, RS) apresentou a maior concentração de ácido protocatecuico, com  $110,86 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ PF}$ . Esta concentração foi muito superior àquela apresentada pelas outras cultivares, e 2,5 vezes superior à mesma cultivar proveniente de Pelotas (RS). Conforme pode ser observado na Tabela 2, as demais cultivares não apresentaram grande variabilidade na concentração deste ácido, o que pode ser confirmado pelo baixo valor do desvio-padrão relativo (0,12). Todas as cultivares coletadas em diferentes locais de produção do Brasil apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a concentração deste ácido.

O ácido clorogênico foi encontrado em concentrações elevadas em todas as cultivares. Estes resultados concordam com aqueles apresentados por Zheng e Wang (2003) onde também foram encontradas altas concentrações deste ácido para a cv. Sierra, com valor médio de  $64,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ PF}$ . Esta concentração é aproximadamente 2 vezes superior à máxima encontrada em nosso trabalho para a cv. Powderblue (Caxias do Sul, RS). A menor concentração, com o valor de  $18,18 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ PF}$  foi encontrada para a cv. Bluecrop, única representante da espécie *Vaccinium corymbosum* avaliada em nosso trabalho. Das amostras coletadas em diferentes locais, apresentaram diferença significativa para a concentração de ácido clorogênico as cvs. Powderblue, Flórida M, Clímax e Bluebelle. O ácido clorogênico apresenta grande importância para a atividade antioxidante do mirtilo. Zheng e Wang (2003) demonstraram esta importância em trabalho que mediu a contribuição dos compostos fenólicos individuais para a atividade antioxidante total da fruta e verificaram que ácido clorogênico foi responsável por 20,9 % da atividade antioxidante total apresentada pelo mirtilo da cv. Sierra.

O ácido caféico foi encontrado em concentrações variando de 1,75 a  $5,60 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ PF}$ , para as cultivares Bluecrop e Bluebelle (Pelotas, RS), respectivamente. Zheng e Wang (2003) não encontraram o ácido caféico quando avaliaram a composição fenólica do mirtilo cv. Sierra. Da mesma forma, Sellappan et. al. (2002) não encontraram o ácido caféico nas cvs. Tifblue e Briteblue produzidas na Geórgia (EUA), contrariando nosso trabalho que encontrou 2,77 e

5,21 mg.100 g<sup>-1</sup> PF, respectivamente, para as mesmas cultivares produzidas no Brasil. Em contrapartida, Sellappan et al. (2002) encontraram concentração similar de ácido caféico para a cv. Woodard, com o valor de 4,07 mg.100 g<sup>-1</sup> PF. Ao mesmo tempo, valores muito superiores de ácido caféico (cvs. Tifblue e Powderblue) foram encontrados por Srisvatava et al. (2007). As cvs. Powderblue, Bluebelle, Flórida M, Bluegem e Clímax provenientes de locais diferentes de produção apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para concentração de ácido caféico.

O ácido ferúlico foi encontrado em concentrações variando de 0,85 a 3,63 mg.100 g<sup>-1</sup> PF. A cultivar Clímax (Barbacena, MG) e Powderblue (Caxias do Sul, RS) apresentaram a menor e maior concentração, respectivamente. As cultivares Powderblue, Clímax e Flórida M produzidas em diferentes locais apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a concentração de ácido ferúlico. Em geral, os valores encontrados em nosso trabalho para o ácido ferúlico são inferiores aos apresentados por Sellappan et al. (2002) e Srisvatava et al. (2007). A presença de ácido ferúlico apresenta grande importância devido aos possíveis efeitos benéficos contra o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e até contra a doença de Alzheimer, como descrito na recente revisão de Zhao e Moghadasian (2008).

Os valores médios de flavonóides não-antociânicos encontrados nas cultivares de mirtilo foram de 4,75 e 3,75 mg.100 g<sup>-1</sup> PF, para a catequina e quercetina, respectivamente. A catequina foi encontrada em concentrações variando de 2,35 a 16,60 mg.100 g<sup>-1</sup> PF. As cultivares Powderblue (Caxias do Sul, RS) e Bluebelle (Campos do Jordão, SP) apresentaram a maior e a menor concentração deste flavanol, respectivamente. Das cinco cultivares coletadas em diferentes locais de produção do Brasil, apenas a cultivar Powderblue apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a concentração de catequina. De modo análogo aos ácidos caféico e ferúlico, a concentração de catequina foi inferior àquela encontrada por Sellappan et al. (2002) e Srisvatava et al. (2007).

Já a quercetina foi encontrada em concentrações variando de 1,40 a 7,37 mg.100 g<sup>-1</sup> para as cultivares Delite e Bluegem (Pelotas, RS), respectivamente. As concentrações encontradas são comparáveis àquelas apresentadas por Häkkinen et al. (2002). As cultivares Powderblue, Bluegem, Clímax e Bluebelle, produzidas em

diferentes locais, apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a concentração deste composto. Em função de sua estrutura, este flavonol apresenta uma elevada atividade antioxidante, que pode ser superior àquela apresentada pelas antocianinas. A dupla ligação 2,3 associada com a função 4-carbonil no anel C da quercetina permite a deslocalização de elétrons do anel B, conferindo grande ressonância, o que resulta em uma grande eficiência na neutralização de radicais livres (RICE-EVANS e MILLER, 1996).

Conforme demonstrado, todas as cultivares de mirtilo produzidas no Brasil apresentam um padrão fenólico qualitativo similar. As diferenças foram observadas apenas na concentração dos ácidos fenólicos e flavonóis não-antociânicos. Estas diferenças podem ser devido aos efeitos da diversidade genética, práticas agrícolas e condições edafoclimáticas, incluindo diferenças na radiação ultravioleta, temperaturas elevadas e estresse hídrico. Considerando que estas e outras variáveis não foram controladas neste estudo, seus efeitos não podem ser especificados. No caso das cultivares coletadas em locais diferentes locais de produção, as diferenças observadas na concentração dos compostos fenólicos estão relacionadas às diferentes práticas agrícolas e condições edafoclimáticas características de cada local de produção.

A análise dos ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos produziu informações relevantes sobre o perfil fenólico das cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil. Estes dados poderão conduzir a uma melhor compreensão da associação entre o consumo desta fruta e suas propriedades funcionais. Os diferentes níveis de compostos fenólicos específicos poderão estar relacionados a diferenças significantes na atuação desta fruta na redução de risco de doenças cardiovasculares, cognitivas, certas formas de câncer e outras doenças crônicas.

## **CONCLUSÃO**

As cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil apresentam um perfil qualitativo de ácidos fenólicos e flavonóides não-antociânicos similar. No entanto, há diferentes níveis de concentrações destes compostos fenólicos em sua

composição. Os ácidos fenólicos protocatecuico e clorogênico como compostos fenólicos majoritários.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro e as empresa Italbraz®, Probst e Fazenda Saint Clair pela doação das amostras.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AMES, B. M.; SHIGENA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 7915 – 7922, 1993.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191 – 203, 2006.

CONNOR, A. M.; LUBY, J. J.; TONG, C. B. S. Genotype and enviromental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 127, p. 89 – 97, 2002.

DAI, Q.; BORENSTEIN, A. R.; WU, Y; JACKSON, J. C.; LARSON, E. B. Fruit and vegetables juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. **The American Journal of Medicine**, v. 119, p. 751 – 759, 2006.

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

GIOVANELLI, G.; BURATTI, S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. **Food Chesmistry**, v. 112, p. 903 – 908, 2009.

GOODWIN, J. S.; BRODWICK, M. Diet, aging, and cancer. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 11, p. 577 – 589, 1995.

HÄKKINEN, S. H.; KARENLAMPI, S. O.; HEINONEN, I. M.; MYKKANEN, H. M.; TORRONEN, A. R. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2274 – 2279, 1999.

HÄKKINEN, S. H.; TÖRRÖNEN, R. Content of favonols and selected phenolic acids in strawberries and vaccinium species: influence of cultivar, cultivation site and technique. **Food Research International**, v. 33, p. 517 – 524, 2000.

HALLIWELL, B.; AESCHBACHT, R.; LOLIGERT, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601 – 617, 1995.

KADER, F.; ROVEL, B; GIRARDIN, M.; METCHE, M. Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.). **Food Chemistry**, v. 55, p. 35 – 40, 1996.

KALT, W.; FORNEY, C. F; MARTIN, A.; PRIOR, R. L. Antioxidant capacity, vitamin c, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 4638 – 4644, 1999.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 36, p. 703 – 725, 2001.

MOYER, R. A.; HUMMER, K. E.; FINN, C. E.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *vaccinium*, *rubus*, and *ribes*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 519 – 525, 2002.

NATELLA, F.; NARDINI, M.; DI FELICE, M.; SCACCINI, C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1453 – 1459, 1999.

NÖTHLINGS, U.; SCHULZE, M. B.; WEIKERT, C.; BOEING, HEINER; SCHOUW, Y. T. V. D.; BAMIA, C.; BENETOU, V.; LAGIOU, P.; KROGH, V.; BEULENS, J. W. J.; PEETERS, P. H. M.; HALKJÆR, J.; TJØNNELAND, A.; TUMINO, R.; PANICO, S.; MASALA, G.; CLAVEL-CHAPELON, F.; LAUZON, B.; BOUTRON-RUAULT, M-C; VERCAMBRE, M-N; KAAKS, R.; LINSEISEN, J.; OVERVAD, K.; ARRIOLA, L.; ARDANAZ, E.; GONZALEZ, C. A.; TORMO, M-J; BINGHAM, S.; KHAW, K-T; KEY, T. J. A.; VINEIS, P.; RIBOLI, E.; FERRARI, P.; BOFFETTA, P.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B.; VAN DER A, D. L.; BERGLUND, G. R.; WIRFÄLT, E.; HALLMAN, G. S; JOHANSSON, I.; LUND, E.; TRICHOPOULO, A. Intake of vegetables, legumes, and fruit, and risk for all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in a european diabetic population. **Nutritional Epidemiology**, v. 138, p. 775 – 781, 2008.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035 – 1042, 2000.

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

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

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.

SRIVASTAVA, A.; AKOH, C. C.; YI, W.; FISCHER, J. KREWER, G. Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2705 – 2713, 2007.

TARUSCIO, T. G.; BARNEY, D. L.; EXON, J. Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *vaccinium* berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3169 – 3176, 2004.

TRICHOPOULOU, A.; CORELLA, D.; MARTINEZ-GONZALEZ, M. A.; SORIGUER, F.; ORDOVAS, J. M. The mediterranean diet and cardiovascular epidemiology. **Nutrition Reviews**, v. 4, p. 13 – 19, 2008.

VECCHIA, C. L. Mediterranean diet and cancer. **Public Health Nutrition**, v. 7, p. 965 – 968, 2004.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 701 – 705, 1996.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the united states. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4026 – 4037, 2004.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 381 – 406, 2001.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic acid profiles in some small berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2118 – 2124, 2005.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, v. 109, p. 691 – 702, 2008.

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, 502 – 509, 2003.