

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

VIVIANE MARCELA CELANT

**CARACTERÍSTICAS BIOATIVAS E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE
AMORAS-PRETAS DURANTE MATURAÇÃO E ARMAZENAMENTO**

Marechal Cândido Rondon

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**CARACTERÍSTICAS BIOATIVAS E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE
AMORAS-PRETAS DURANTE MATURAÇÃO E ARMAZENAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Nível Mestrado e Doutorado, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Costa Braga.

Co-orientadora: Prof.^ª Dr.^ª Fabíola Villa.

Marechal Cândido Rondon

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE - Campus de Marechal Cândido Rondon - PR., Brasil)

C392c Celant, Viviane Marcela
Características bioativas e respostas fisiológicas de
amoras-pretas durante maturação e armazenamento/ Viviane
Marcela Celant. - Marechal Cândido Rondon, 2013.
126p.

Orientador : Prof. Dr. Gilberto Costa Braga
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabíola Villa
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2013.

1. Amora-preta- Características bioativas. 2. Amora-preta -
Respostas fisiológicas. 3. Amora-preta - Respostas
bioquímicas. 4. Maturação. 5. Armazenamento. 5. Pós-colheita. 6.
Rubus spp. 7. Fenólicos totais I. Universidade Estadual do
Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 634.38
CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio CRB-9/965



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Bióloga **VIVIANE MARCELA CELANT**. Aos trinta dias do mês de agosto de 2013, às 8h, sob a presidência do Prof. Dr. Gilberto Costa Braga, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Bióloga Viviane Marcela Celant, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Agronomia – Nível Mestrado e Doutorado, com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"DOUTORA EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Prof.^a Dr.^a Gláucia Cristina Moreira (UTFPR), Prof.^a Dr.^a Suzana Lucy Nixdorf (UEL), Prof. Dr. José Renato Stangarlin (Unioeste), Prof.^a Dr.^a Fabíola Villa (Unioeste) e Prof. Dr. Gilberto Costa Braga (Orientador).

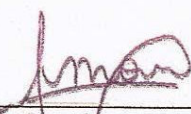
Iniciados os trabalhos, a candidata apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua tese, intitulada: **"Características bioativas e respostas fisiológicas de amoras-pretas durante maturação e armazenamento"**.

Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

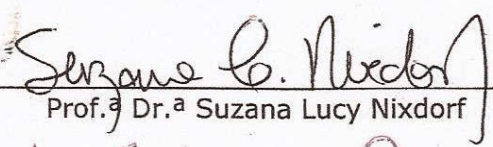
Prof.^a Dr.^a Gláucia Cristina Moreira.....Aprovado
Prof.^a Dr.^a Suzana Lucy Nixdorf.....Aprovado
Prof. Dr. José Renato StangarlinAprovado
Prof.^a Dr.^a Fabíola Villa.....Aprovado
Prof. Dr. Gilberto Costa Braga (Orientador).....Aprovado

Apurados os resultados, verificou-se que a candidata foi habilitada, fazendo jus, portanto, ao título de **"DOUTORA EM AGRONOMIA"**, área de concentração: **"PRODUÇÃO VEGETAL"**. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

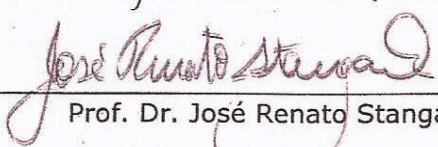
Marechal Cândido Rondon, 30 de agosto de 2013.



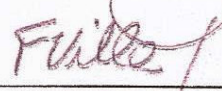
Prof.^a Dr.^a Gláucia Cristina Moreira




Prof.^a Dr.^a Suzana Lucy Nixdorf



Prof. Dr. José Renato Stangarlin



Prof.^a Dr.^a Fabíola Villa



Prof. Dr. Gilberto Costa Braga (Orientador)

Dedico...

*Ao meu marido Christian... meu eterno amor e
gratidão por tudo o que fez e o que representa para
mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Gilberto Costa Braga pela orientação e por compartilhar todo o seu conhecimento e sua experiência;

À professora Fabíola Villa, pela co-orientação, pelos conselhos e também pela grande ajuda principalmente prática no desenvolvimento do trabalho;

Ao professor José Renato Stangarlin, que além de um exemplo de professor é também um exemplo de pessoa;

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade concedida;

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Meu agradecimento, carinho e respeito ao meu marido Christian, que está sempre ao meu lado me apoiando em todos os momentos;

Aos meus pais Valter e Elaine, por me educarem, permitindo e incentivando, que eu sempre fizesse com dedicação aquilo que amo. As minhas irmãs Karla e Kamila, que fazem minha vida ser mais bela e também ao meu cunhado Marcus, por me ajudar sempre que necessário;

À Amy, minha inseparável companheira nas longas horas de dedicação à escrita da tese, obrigada por sempre estar ao meu lado!

À Cristiane Meinerz, que nas horas que ainda lhe restavam da sua agenda super disputada sempre nos ajudou, emprestando reagentes do laboratório de Fitopatologia, auxiliando em metodologias, e principalmente pela sua disposição em estar sempre presente quando mais precisávamos;

Agradeço à Jéssica Ariane Vorpagel pela sua disponibilidade em me ajudar com as análises, em meio a tantas análises também demos muitas risadas!

Aos colegas de jornada, Maria Cristina Copello Rotili, Sidiane Coltro, Alice Jacobus de Moraes e Jacir Daga;

Às queridas Priscilla Oro e Cátia R. Volkweis, amigas que conheci durante a realização do doutorado;

A todos os professores e funcionários da Unioeste - Campus Marechal Cândido Rondon;

Enfim, a todos que estiveram presentes e participaram de forma direta ou indireta de mais esta conquista, os mais sinceros agradecimentos. Obrigada!

“A vida é um piano.
Teclas brancas representam a felicidade
E as pretas a angústia.
Com o passar do tempo você percebe
Que as teclas pretas também fazem música.”
- A Última Música, Nicholas Sparks.

CELANT, Viviane Marcela. **Características bioativas e respostas fisiológicas de amoras-pretas durante maturação e armazenamento.** 2013. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon. 2013.

RESUMO

A amora-preta (*Rubus* spp.) apresenta alta qualidade nutricional, é rica em vitamina C, carboidratos, minerais, vitaminas do complexo B e A, além de ser fonte de compostos funcionais. A amora-preta é excelente fonte de antioxidantes naturais, como antocianinas e polifenóis. É um fruto não climatérico e, devido à sua fragilidade física e altas taxas de respiração e transpiração, seus frutos são extremamente perecíveis, fator este que torna limitante a sua comercialização *in natura*. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características bioativas, respostas fisiológicas e bioquímicas de cultivares de amora-preta durante a maturação e armazenamento em diferentes embalagens. Para tanto, três experimentos foram conduzidos. O primeiro constou da avaliação dos conteúdos de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas totais, da capacidade antioxidante e das características químicas dos extratos aquoso e etanólico dos frutos das cultivares de amora-preta Brazos, Tupy, Arapaho, Choctaw e Guarani. Os resultados mostraram que etanol 80% foi mais eficiente na extração de antocianinas totais para todas as cultivares e o conteúdo de flavonoides totais foi superior em ‘Guarani’. A eficiência de sequestro dos radicais TEAC e DPPH foi dependente do solvente utilizado na extração, com maior capacidade antioxidante TEAC nos extratos aquosos e maior capacidade antioxidante DPPH nos extratos etanólicos. Independente do solvente de extração, ‘Arapaho’ apresentou a maior capacidade antioxidante. No segundo experimento foram avaliados os mesmos parâmetros do experimento 1, porém apenas em extrato etanólico dos frutos de ‘Brazos’ e ‘Tupy’ nos estádios de maturação imaturos, intermediários e maduros. ‘Brazos’ e ‘Tupy’ apresentaram conteúdos de compostos fenólicos totais mais elevados no estágio imaturo. A atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS foi maior em frutos maduros. A atividade antioxidante DPPH foi maior em ‘Brazos’ quando imaturos, ‘Tupy’ apresentou valores similares ao ensaio ABTS. Ocorreram aumentos no conteúdo de ácido ascórbico conforme a maturação dos frutos de ‘Brazos’ e ‘Tupy’. No terceiro experimento também foram avaliados os mesmos parâmetros dos demais experimentos, apenas em solvente etanólico, juntamente com a atividade enzimática de frutos de amora-preta ‘Tupy’, embalados em embalagens de politereftalato de etileno e filme de policloreto de vinila e armazenados por 1, 4 e 8 dias em ambiente refrigerado. A perda de massa fresca foi menor em frutos armazenados em embalagem PET. Foram verificados acréscimos no conteúdo de ácido ascórbico nos frutos entre o 1º ao 4º dia em ambas as embalagens. A atividade antioxidante DPPH e ABTS dos frutos embalados com PET foi superior aos frutos com PVC. Compostos fenólicos aumentaram significativamente com o armazenamento em ambas as embalagens utilizadas, sendo os maiores teores encontrados para frutos mantidos em PVC ao final do armazenamento. Os teores de antocianinas também foram superiores no 8º dia do armazenamento, principalmente em frutos mantidos em embalagem do tipo PET. Ao final dos 8 dias de armazenamento a atividade de peroxidase foi maior para frutos mantidos em PVC, e a atividade de fenilalanina amônia-liase apresentou-se maior nos frutos embalados em PET para todos os períodos de armazenamento.

Palavras-chave: *Rubus* spp., fenólicos totais, flavonoides, capacidade antioxidante, atividade enzimática

CELANT, Viviane Marcela. **Bioactive characteristics and physiological responses of blackberries during ripening and storage.** 2013. Doctorate thesis of Agronomy – State University of West Paraná, Marechal Cândido Rondon. 2013.

ABSTRACT

The blackberry (*Rubus* spp.) has high nutritional quality, is rich in vitamin C, carbohydrates, minerals, vitamins A and B, as well as being a source of functional compounds. The blackberry is an excellent source of natural antioxidants, such as anthocyanins and polyphenols. It is a non-climacteric fruit and, due to their physical fragility and high rates of respiration and perspiration, its fruits are highly perishable, this factor becomes limiting your marketing fresh. The objective of this work was to evaluate the bioactive characteristics, physiological and biochemical characteristics of blackberry cultivars during maturation and storage in different packaging. Therefore, three experiments were conducted. The first consisted of evaluating the content of phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins, antioxidant capacity and chemical characteristics of aqueous and ethanol extracts of the fruits of blackberry cultivars Brazos, Tupy, Arapaho, Choctaw and Guarani. The results showed that 80% ethanol was more efficient in extracting anthocyanins in all cultivars and total flavonoid content was higher in 'Guarani'. The efficiency of sequestration of TEAC and DPPH radical was dependent on the solvent used in the extraction, with higher antioxidant capacity in aqueous and TEAC highest antioxidant capacity in DPPH ethanol extracts. Regardless of the extraction solvent, 'Arapaho' had the highest antioxidant capacity. The second experiment evaluated the same parameters of experiment 1, but only in the ethanol extract of the fruit of 'Brazos' and 'Tupy' on maturation of immature, intermediate and mature. 'Brazos' and 'Tupy' showed total phenolic content higher in the immature stage. Antioxidant activity by ABTS method was higher in ripe fruits. The DPPH antioxidant activity was higher in 'Brazos' when immature, 'Tupy' showed similar values to the ABTS assay. Increases in the content of ascorbic acid as the fruit ripening of 'Brazos' and 'Tupy'. In the third experiment also evaluated the same parameters of other experiments, only in ethanol solvent, together with the enzymatic activity of fruits of blackberry 'Tupy' , packaged in polyethylene terephthalate and polyvinyl chloride film, and stored for 1 , 4 and 8 days in a refrigerated environment. The weight loss was lower in fruits stored in PET packaging. There were some increases in the content of ascorbic acid in fruits from the 1st to the 4th day in both packages. The DPPH and ABTS antioxidant activity of fruit wrapped in PET was superior to fruits with PVC. Phenolic compounds increased with storage in both packaging used, with the highest levels found in fruits stored in PVC at the end of storage. The anthocyanin contents were also higher on the 8th day of storage, especially in fruits kept in the PET packaging. At the end of the 8 days of storage the peroxidase activity was higher in fruits stored in PVC, and the activity of phenylalanine ammonia - lyase was higher in fruits packed in PET for all storage periods.

Keywords: *Rubus* spp., total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity, enzymatic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hastes (a) e fruto (b) da amoreira-preta ‘Tupy’	21
Figura 2: Hastes (a) e fruto (b) da amoreira-preta ‘Brazos’	22
Figura 3: Hastes (a) e frutos (b) da amoreira-preta ‘Arapaho’	22
Figura 4: Hastes (a) e fruto (b) da amoreira-preta ‘Choctaw’	23
Figura 5: Hastes (a) e fruto (b) da amoreira-preta ‘Guarani’	24
Figura 6: Estrutura química de um fenol simples.....	33
Figura 7: Metabolismo de compostos fenólicos: rota do ácido chiquímico e do ácido malônico.....	34
Figura 8: Estrutura química dos principais ácidos hidroxibenzóicos.....	37
Figura 9: Estrutura química dos principais ácidos hidroxicinâmicos.....	37
Figura 10: Estrutura química básica de um flavonol.....	41
Figura 11: Estrutura química básica de um flavanol.....	43
Figura 12: Estrutura básica de uma antocianidina.....	44
Figura 13: Estrutura química da cianidina-3-glicosídeo (a) e da ciandina-3 rutinosídeo (b).....	45
Figura 14: Estrutura do ácido gálico, ácido elágico, galoil-bis-HHDP glicose, sanguin H-6/lambertianina A e lambertianina C.....	48
Figura 15: Estrutura da molécula do ácido L-ascórbico e do ácido dehidroascórbico.....	49
Figura 16: Estrutura química do DPPH [•] e reação com um antioxidante.....	56
Figura 17: Redução do ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	58
Figura 18: Ação da peroxidase (POD) sobre compostos fenólicos.....	60
Figura 19: Desaminação do aminoácido L-fenilalanina pela fenilalanina amônia-liase.....	61
Figura 20: Pomar localizado no Município de Marechal Cândido Rondon (a) e sistema de condução das amoreiras-pretas sob espaldeira simples de um fio em “T”.	63
Figura 21: Frutos maduros das cinco cultivares de amoreira-preta.....	63
Figura 22: Frutos da cultivar Brazos nos 3 estádios de maturação.....	65
Figura 23: Frutos da cultivar Tupy nos 3 estádios de maturação.....	66
Figura 24: Embalagem plástica tipo PET (politereftalato de etileno).....	67

Figura 25: Embalagem plástica de filme PVC (policloreto de vinila) e bandeja de EPS (poliestireno expandido).....	67
Figura 26: Armazenamento em câmara climatizada a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 85-90% de UR...	67
Figura 27: Curva de calibração do ácido gálico para cálculo do teor de compostos fenólicos totais.....	69
Figura 28: Curva de calibração da quercetina para cálculo do teor de flavonoides totais.....	70
Figura 29: Curva de calibração do trolox para cálculo da capacidade antioxidante pelo método TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>).....	71
Figura 30: Curva de calibração do trolox para cálculo da capacidade antioxidante pelo método DPPH.....	72
Figura 31: Atividade antioxidante da amora-preta ‘Tupy’ durante armazenamento nas embalagens filme de PVC e PET.....	92
Figura 32: Características físico-químicas da amora-preta ‘Tupy’ durante armazenamento nas embalagens plásticas de PVC e PET.....	95
Figura 33: Degradação de frutos de amora-preta ‘Tupy’ durante armazenamento nas embalagens plásticas PVC e PET.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxa respiratória de amora-preta, expressa em produção de dióxido de carbono ($\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) a várias temperaturas.....	26
Tabela 2: Composição química de amora-preta.....	31
Tabela 3: Classificação dos compostos fenólicos em plantas.....	35
Tabela 4: Antocianinas e flavonoides identificados em amora-preta.....	42
Tabela 5: Compostos fenólicos das cinco cultivares de amora-preta, extraídos com solvente aquoso e etanólico. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	76
Tabela 6: Antocianinas e flavonoides totais das cinco cultivares de amora-preta, extraídos com solvente aquoso e etanólico. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	77
Tabela 7: Capacidade antioxidante TEAC dos extratos aquoso e etanólico dos frutos das cinco cultivares de amora-preta. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	79
Tabela 8: Capacidade antioxidante DPPH dos extratos aquoso e etanólico dos frutos das cinco cultivares de amora-preta. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	80
Tabela 9: Coeficientes de correlação linear de <i>Pearson</i> entre capacidade antioxidante e composição fenólica para os extratos aquoso e etanólico das amoras-pretas ‘Brazos’ e ‘Tupy’. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	80
Tabela 10: Caracterização química dos frutos frescos das cultivares de amora-preta. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	82
Tabela 11: Compostos fenólicos das amoras-pretas ‘Brazos’ e ‘Tupy’ em três estádios de maturação. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	83
Tabela 12: Antocianinas e flavonoides totais das amoras-pretas ‘Brazos’ e ‘Tupy’ em três estádios de maturação. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	84
Tabela 13: Capacidade antioxidante TEAC das amoras-pretas ‘Brazos’ e ‘Tupy’ em três estádios de maturação. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	85
Tabela 14: Capacidade antioxidante DPPH das amoras-pretas ‘Brazos’ e ‘Tupy’ em três estádios de maturação. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	86
Tabela 15: Coeficientes de correlação linear de <i>Pearson</i> entre as variáveis de composição e capacidade antioxidante das cultivares Brazos e Tupy. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	87
Tabela 16: Conteúdo de ácido ascórbico dos frutos de duas cultivares de amora-preta em três estádios de maturação. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	88
Tabela 17: Caracterização química dos frutos de duas cultivares de amora-preta em	

três estádios de maturação. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	88
Tabela 18: Compostos fenólicos da amora-preta ‘Tupy’ durante armazenamento nas embalagens filme de PVC e PET. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	90
Tabela 19: Antocianinas totais e flavonoides da amora-preta ‘Tupy’ durante armazenamento nas embalagens filme de PVC e PET. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	91
Tabela 20: Coeficientes de correlação linear de <i>Pearson</i> entre as variáveis de composição fenólica, atividade enzimática e capacidade antioxidante das duas embalagens PVC e PET. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	93
Tabela 21: Atividade de peroxidase (PO) e fenilalanina amônia liase (FAL) de frutos da amora-preta ‘Tupy’ durante armazenamento nas embalagens plásticas PVC e PET. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.....	93

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Gerais.....	17
2.2 Específicos.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Amora-preta.....	18
3.1.1 Botânica.....	18
3.1.2 Cultivares.....	19
3.1.2.1 ‘Tupy’.....	20
3.1.2.2 ‘Brazos’.....	21
3.1.2.3 ‘Arapaho’.....	22
3.1.2.4 ‘Choctaw’.....	23
3.1.2.5 ‘Guarani’.....	24
3.1.3 Produção, comercialização e consumo.....	24
3.1.4 Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta.....	25
3.1.5 Armazenamento com atmosfera modificada.....	27
3.1.6 Cultivo de amoreiras em regiões subtropicais.....	29
3.2 Composição nutricional.....	30
3.3 Compostos fenólicos.....	32
3.3.1 Ácidos fenólicos ou não-flavonoides.....	36
3.3.2 Flavonoides.....	39
3.3.3 Taninos.....	46
3.4 Ácido ascórbico.....	48
3.5 Propriedades bioativas e fitoterápicas.....	50
3.5.1 Doenças Cardiovasculares.....	51
3.5.2 Câncer.....	52
3.5.3 Outras doenças.....	53
3.6 Métodos de avaliação da atividade antioxidante.....	54
3.6.1 Atividade sequestrante do radical livre DPPH (DPPH’.....	56
3.6.2 Atividade antioxidante pelo método do ABTS ⁺	57
3.7 Qualidade pós-colheita.....	58
3.7.1 Perda de massa.....	58

3.7.2 Acidez titulável.....	59
3.7.3 Sólidos solúveis.....	59
3.8 Peroxidase (POD) e fenilalanina amônia-liase (FAL).....	60
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.1 Condução, local e amostras experimentais.....	63
4.2 Planejamento experimental.....	64
4.2.1 Composição fenólica e atividade antioxidante de frutos de amora-preta extraídos em água e etanol.....	64
4.2.2 Composição fenólica e atividade antioxidante de amoras-pretas durante maturação.....	65
4.2.3 Composição fenólica, capacidade antioxidante e atividade de fenilalanina amônia-liase e peroxidase de amora-preta armazenada em diferentes embalagens.....	66
4.3 Análises experimentais.....	68
4.3.1 Extração.....	68
4.3.2 Compostos fenólicos totais.....	69
4.3.3 Flavonoides totais.....	69
4.3.4 Antocianinas totais.....	70
4.3.5 Capacidade antioxidante.....	71
4.3.5.1 Método TEAC (<i>'Trolox Equivalent Antioxidant Capacity'</i>).....	71
4.3.5.2 Método DPPH.....	72
4.3.6 Perda de massa fresca, sólidos solúveis, acidez titulável, <i>ratio</i> , pH e ácido ascórbico.....	73
4.3.7 Atividade enzimática.....	73
4.3.7.1 Obtenção da preparação enzimática.....	73
4.3.7.2 Peroxidase (POD).....	74
4.3.7.3 Fanilalanina amônia-liase (FAL).....	74
4.3.8 Degradação pós-colheita.....	74
4.3.9 Identificação dos fungos.....	75
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
5.1 Capítulo 1: Composição fenólica e atividade antioxidante de frutos de amoreira-preta extraídos em água e etanol.....	76

5.1.1 Compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides.....	76
5.1.2 Capacidade antioxidante.....	78
5.1.3 Características químicas.....	81
5.1.4 Conclusões.....	82
5.2 Capítulo 2: Composição fenólica e atividade antioxidante de amoras-pretas durante maturação.....	83
5.2.1 Compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides.....	83
5.2.2 Capacidade antioxidante.....	85
5.2.3 Características químicas.....	88
5.2.4 Conclusões.....	89
5.3 Capítulo 3: Composição fenólica, capacidade antioxidante e atividade de fenilalanina amônia-liase e peroxidase de amora-preta armazenada em diferentes embalagens.....	90
5.3.1 Compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides.....	90
5.3.2 Capacidade antioxidante.....	92
5.3.3 Atividade de peroxidase (POD) e fenilalanina amônia-liase (FAL).....	93
5.3.4 Características físico-químicas.....	94
5.3.5 Degradação pós-colheita.....	98
5.3.6 Fungos identificados.....	99
5.3.7 Conclusões.....	100
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	101
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

A amora-preta (*Rubus* spp.) apresenta alta qualidade nutricional, valor econômico significativo (ANTUNES, 2002) e são fontes de antioxidantes naturais (KOCA; KARADENIZ, 2009), como antocianinas (DEIGHTON et al., 2000) e polifenóis (WANG; LIN, 2000; MOYER et al., 2002). Diversos estudos relataram a maior capacidade antioxidante de amoras com base em sua capacidade de absorção do radical oxigênio, em comparação com outros frutos (WANG; LIN, 2000; MOYER et al., 2002; PRIOR et al., 2003; CHO et al., 2004).

Apesar do grande interesse de produtores e consumidores pela amora-preta, principalmente pelo potencial de consumo associado às suas propriedades benéficas à saúde, existem poucas pesquisas sobre seu valor nutricional e potencial industrial (HARBONE; WILLIAMS, 2000). No Brasil a amora foi introduzida na década de 70 pela Embrapa Clima Temperado conduzindo programa de melhoramento genético para desenvolver cultivares de amoras adaptadas à região sul do Brasil, incluindo ‘Guarani’, ‘Caingangue’, ‘Xavante’ e ‘Tupy’. Devido às características climáticas adequadas (clima temperado), o Rio Grande do Sul foi o primeiro estado do Brasil a produzir amoras e ainda é o principal produtor (ANTUNES, 2002).

América do Norte, Europa, Ásia, América do Sul, América Central, Oceania e África (em ordem decrescente de produção) são as principais regiões de produção de amora-preta no mundo (STRIK et al., 2008). No entanto, pesquisas tem se concentrado em variedades comerciais cultivadas em climas temperados, com pouca atenção dada às variedades cultivadas nas regiões tropicais ou subtropicais. Diversas pesquisas são relatadas sobre a composição e capacidade antioxidante da amora-preta, mas ainda são poucos os relatos de pesquisas desta natureza para cultivares de *Rubus* spp. produzidas nas condições subtropicais do sul do Brasil.

Fatores genéticos e ambientais, como cultivar, maturidade, exposição à luz e colheita, desempenham importante influência na composição dos frutos (HARBORNE 1984). É bem conhecido que os níveis de compostos fenólicos e a atividade antioxidante são influenciados pela maturidade (KOBAYASHI et al., 2008; PEDISIC et al., 2007; PRIOR et al., 1998; WANG; LIN, 2000) e a variação desses níveis pode ocorrer devido às diferentes cultivares (JIAO; WANG, 2000).

Compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário de plantas e da rota fenilalanina amônia-liase, possuindo em sua estrutura pelo menos um anel aromático com um

ou mais grupamentos hidroxilas (NACZK; SHAHIDI, 2004). São divididos em flavonoides (antocianinas, flavonois e isoflavonas) e não-flavonoides (ácidos fenólicos) (ANGELO; JORGE, 2007; SIRIWOHARN et al., 2004; KING; YOUNG, 1999), e estão amplamente distribuídos nos vegetais (BARROS et al., 2011; PEREIRA et al., 2012). Pesquisas recentes tem comprovado a existência de propriedades benéficas dos compostos fenólicos na saúde humana, atuando como antioxidantes, anticancerígenos e antidiabéticos (ABDALLAH et al., 2011; LEE et al., 2005).

Antocianinas são pigmentos solúveis em água responsáveis pelas cores laranja, vermelha e azul de muitos frutos, folhas, flores e raízes (WU; PRIOR, 2005). Além das antocianinas, amoras-pretas contêm elevados níveis de elagitaninos (MERTZ et al., 2007; KOPONEN et al., 2007) e outros compostos fenólicos, como flavan-3-óis, procianidinas e lignanas que contribuem para sua elevada capacidade antioxidante (BUSHMAN et al., 2004; GU et al., 2004; CHO et al., 2005; WU et al., 2006; MAZUR et al., 2007).

Frutos de amoreira-preta (*Rubus* spp.) são extremamente perecíveis devido à sua fragilidade física e altas taxas de respiração e transpiração, levando a rápidas alterações nas propriedades físico-químicas e crescimento de fungos durante o período pós-colheita (HARDENBURG et al., 1986). Em geral, a vida-útil dos frutos de amoreira-preta mantidos a 0 °C é de 3 dias (HARDENBURG et al., 1986). Porém, pesquisas mostraram que frutos de algumas cultivares suportam 7 dias quando mantidas a 5 °C (CLARK; MOORE, 1990).

A maturação da amora-preta pode ser determinada pela cor de superfície do fruto, teor de sólidos solúveis, acidez titulável e aroma característico (COUTINHO et al., 2004). Depois de colhidos, os frutos continuam a respirar e passam por transformações endógenas resultantes do metabolismo, que refletem mudanças irreversíveis nas suas características, levando a senescência (ABREU et al., 1998).

Estresses como luz, temperatura, água e ferimento afetam a fisiologia do produto fresco e podem iniciar acúmulos de compostos fenólicos ou outros metabólitos secundários (REYES et al., 2007), responsáveis, por exemplo, pela proteção da planta por meio de barreiras polifenólicas (STODOLAK et al., 2003). Além disso, algumas enzimas são responsáveis pela degradação oxidativa de compostos fenólicos, como as peroxidases (POD), e estão envolvidas em diversas reações, como ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa contra patógenos, regulação do alongamento de células e outras (SHIH-YUNG; KAO, 2003).

A redução da temperatura a níveis adequados e o uso de embalagens plásticas estão entre as técnicas mais eficazes para redução da atividade respiratória e aumento da vida pós-colheita de frutos armazenados (CHITARRA; CHITARRA, 2005). O envolvimento de frutos e hortaliças em embalagens plásticas é uma maneira simples de modificar a atmosfera durante o armazenamento (CHITARRA; PRADO, 2002; SARANTÓPOULOS et al., 1998). Dentre os materiais de embalagens plásticas disponíveis, o polietileno tereftalato (PET) e o policloreto de vinila (PVC) têm sido utilizados para a armazenagem e conservação de frutos. Tais embalagens podem diminuir a taxa respiratória e, conseqüentemente, reduzir as reações metabólicas promovidas pela diminuição nos níveis de O_2 e aumento de CO_2 (MATHOOKO, 1996).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Devido há poucas informações disponíveis sobre aspectos fisiológicos e bioquímicos da amora-preta, especialmente relacionadas a fatores genéticos e de conservação pós-colheita, o presente estudo teve por objetivo avaliar as características bioativas, respostas fisiológicas e bioquímicas de cultivares de amora-preta durante a maturação e armazenamento em diferentes embalagens.

2.2 Específicos

- Avaliar os conteúdos de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas totais e a capacidade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico dos frutos de cinco cultivares de amoreira-preta produzidas na região sul do Brasil;

- Avaliar os conteúdos totais de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas, a capacidade antioxidante e as características químicas de qualidade dos frutos de duas cultivares de amoreira-preta em três estádios de maturação;

- Avaliar a atividade antioxidante, os conteúdos de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas totais e a atividade enzimática (POD-FAL) de frutos de amoreira-preta ‘Tupy’, produzidas na região oeste do Paraná e acondicionadas em dois diferentes tipos de embalagens fechadas, feitas a partir de politereftalato de etileno (PET) e poliestireno expandido (EPS) coberto por filme de plástico de policloreto de vinila.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Amora-preta

3.1.1 Botânica

A amoreira-preta (*Rubus* spp.) faz parte de um grande grupo de plantas do gênero *Rubus*. Este gênero pertence à família Rosaceae, na qual existem outros gêneros de importância para a fruticultura brasileira (ANTUNES, 2002). O gênero *Rubus* contém aproximadamente 740 espécies, divididas segundo alguns autores, em 12 subgêneros ou segundo outros em 15 subgêneros (DAUBENY, 1996). Este gênero agrega entre 400 a 500 espécies de framboesa e amora-preta na América, Europa, África e Ásia (BASSOLS, 1980; POLING, 1996).

Caracterizações do gênero *Rubus* são difíceis de serem realizadas devido à diversidade do hábito de crescimento das plantas e distribuição das espécies. Muitas delas têm sistema radicular perene e ramos bianuais (ANTUNES, 2002). Em geral, as plantas têm hastes bianuais, as quais necessitam de um período de dormência antes de frutificar. A espécie *Rubus procerus* é uma exceção, pois tem hastes semi-perenes que frutificam por diversos anos antes de morrer. O hábito de crescimento das hastes varia de ereta a prostrada, podendo ter hastes com ou sem espinhos, sendo este último um caráter genético recessivo (RASEIRA et al., 2004).

A amoreira-preta é uma espécie arbustiva de porte ereto ou rasteiro, que produz frutos agregados, com cerca de 3 a 12 g, de acordo com as variedades, de coloração negra e sabor ácido a doce-ácido. O fruto verdadeiro da amoreira é denominado de minidrupa ou drupete, no qual existe uma pequena semente, sendo que a união de várias minidrupas forma o que é chamado de fruto agregado (STRIK, 2007). O fruto da amoreira-preta difere do fruto da framboeseira pelo fato do receptáculo permanecer na haste da framboesa no momento da colheita, formando uma baga oca, enquanto na amora-preta o receptáculo permanece no fruto (DICKERSON, 2000).

Normalmente as cultivares de amoreira-preta são agrupadas de acordo com o hábito de crescimento de suas hastes, sendo classificadas em três tipos, sendo rasteiras, semi-eretas e eretas (CLARK, 2006).

As cultivares eretas, quando manejadas adequadamente, podem ser cultivadas sem sustentação, porém respondem melhor quando se utiliza sustentação. Já as rasteiras e semi-eretas necessitam ser conduzidas com sistema de sustentação (FERNANDEZ; BALLINGTON, 1999). Geralmente são recomendadas cultivares eretas por exigirem menor mão-de-obra e ainda menor custo de implantação. As cultivares eretas geralmente apresentam espinhos em suas principais cultivares, o que exige do operador, durante a colheita, muito cuidado com sua integridade física e com a qualidade do fruto (WHITWORTH, 2007).

A amoreira-preta possui sistema radicular perene e hastes bienais. Essas hastes desenvolvem-se na primeira estação de crescimento e produzem frutas no verão seguinte. Após frutificarem, as hastes morrem e devem ser retiradas (DICKERSON, 2000). Cultivares rasteiras apresentam sistema radicular mais profundo, capaz de obter umidade a maiores profundidades, sendo mais resistentes a seca que a maioria das cultivares eretas ou mesmo em relação às framboeseiras. Tendem a florescer e amadurecer mais cedo que cultivares eretas, o que as torna mais suscetíveis ao frio, além de geralmente produzirem agrupamentos de frutos menores, mais abertos e mais doces, porém tendem a ser danificados mais facilmente que as cultivares eretas (FERNANDEZ; BALLINGTON, 1999). As cultivares rasteiras e semi-eretas têm pouca produção de brotos de raiz e normalmente produzem novas hastes de brotações da coroa, já cultivares eretas, têm grande capacidade para formar brotações vegetativas das raízes e prontamente produzem hastes novas de raízes e coroas (FERNANDEZ; BALLINGTON, 1999).

A maioria das cultivares são de autopolinização, porém maiores rendimentos e melhor qualidade são obtidas com polinização cruzada. São recomendadas quatro ou mais colméias de abelhas por hectare (GRANDALL, 1995).

3.1.2 Cultivares

O cultivo da amora-preta começou na segunda metade do século XIX nos Estados Unidos, onde é conhecida como *blackberry*. No Brasil, embora existam espécies nativas do gênero *Rubus*, a amoreira-preta só começou a ser pesquisada a partir de em 1972, pela Embrapa Clima Temperado, então Estação Experimental de Pelotas no Rio Grande do Sul, sendo a primeira coleção implantada em 1974 no município de Canguçu, RS (PAGOT, 2006). Esta cultura apresentou boa adaptação e tem alcançado alta produtividade devido às condições

climáticas desta região, a qual permite o cultivo de frutas das espécies de clima temperado (ANTUNES, 2002; ANTUNES; RASEIRA, 2004; NACHTIGALL et al., 2004).

As primeiras cultivares introduzidas foram ‘Brazos’, ‘Comanche’ e ‘Cherokee’, oriundas da Universidade do Arkansas nos Estados Unidos (RASEIRA et al., 1984; RASEIRA et al., 1992). Já em 1975, foi dado início ao programa de melhoramento genético com o plantio de sementes produzidas por mais de cinquenta cruzamentos efetuados na Universidade de Arkansas, que originaram mais de 12.000 *seedlings*, e que deram origem as primeiras cultivares brasileiras, que são: ‘Ébano’, em 1981 (BASSOLS; MOORE, 1981a) e ‘Negrita’, em 1983 (RASEIRA et al., 1992). Em 1988, foram lançadas ‘Tupy’ e ‘Guarani’ (SANTOS; RASEIRA, 1988), e em 1992, a cultivar Caingangue (RASEIRA et al., 1992). Em 2004 foi lançada a cultivar Xavante, que possui como principal característica a ausência de espinhos em suas hastes e o crescimento ereto (RASEIRA et al., 2004).

As cultivares estudadas nesta pesquisa foram ‘Tupy’, ‘Brazos’, ‘Arapaho’, ‘Choctaw’ e ‘Guarani’, devido à sua maior produtividade na região oeste do Paraná, e são descritas a seguir:

3.1.2.1 ‘Tupy’

É atualmente a cultivar de amora-preta mais plantada no Brasil, além de ocupar uma posição de destaque no México onde é produzida, principalmente, para exportação aos Estados Unidos. É resultante de cruzamento realizado entre ‘Uruguai’ e a cultivar Comanche. ‘Uruguai’ era um clone originário daquele país e cuja identidade não era conhecida. As hastes são eretas e com espinhos (Figura 1a). As frutas são de sabor doce-ácido, sendo um pouco mais ácido que doce. O teor de sólidos solúveis varia de 8 a 10° Brix. A maturação é precoce, sendo a colheita realizada em novembro (ANTUNES; RASEIRA, 2004).

É recomendada para o consumo *in natura* pelo fato de apresentar baixa acidez (SANTOS; RASEIRA, 1988). As plantas da cultivar Tupy são de porte ereto, vigorosas, com espinhos, perfilhamento médio e florescem em setembro e outubro. A colheita, nas condições de Pelotas, ocorre entre meados de novembro a início de janeiro. Os frutos têm 8 a 10 g de peso médio e sabor equilibrado (acidez/ açúcar) (GONÇALVES et al., 2011).

Produz frutos grandes de cor preta e uniforme (Figura 1b). Ideal para consumo ao natural, pelo equilíbrio que mantém entre a acidez e o açúcar. No primeiro ano pós-plantio, a produtividade pode chegar a 8 t ha⁻¹ e, no segundo ano, 17 t ha⁻¹ (GONÇALVES et al., 2011).

No Rio Grande do Sul, as maiores produções encontram-se nos municípios de Feliz e Vacaria, onde a cultivar Tupy responde por 70% da área cultivada, com produção a partir do dia 20 de novembro. Em São Paulo a produção concentra-se na região de Jundiá e em Minas Gerais no Sul (Planalto de Poços de Caldas) (ANTUNES et al., 2000) e Zona da Mata (Barbacena).

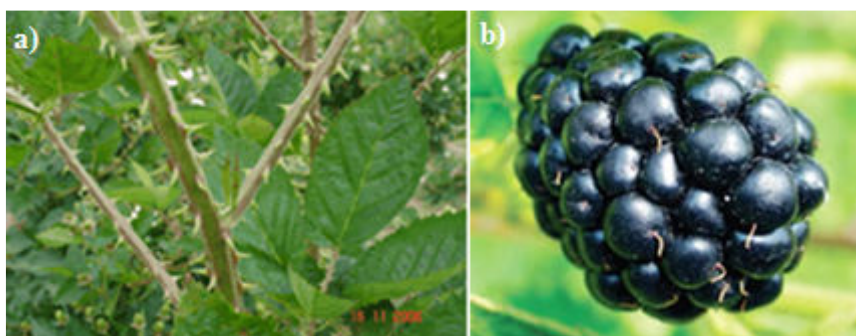


Figura 1. Hastes (a) e fruto (b) da amoreira-preta ‘Tupy’

Fonte:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amora/SistemaProducaoAmoreiraPreta/botanica.htm>, 2008.

3.1.2.2 ‘Brazos’

Entre as cultivares de amoreira-preta norte-americanas, Brazos é a que mais se destaca. Sua origem é no estado americano do Texas, lançada pela Universidade do Texas (Texas A&M University), resultado da seleção da segunda geração entre Lawton e Nessberry (Tetraplóide ($4n=28$ cromossomos), sendo introduzida no ano de 1959. Sua área de adaptação vai da Costa do Golfo, norte ao centro de Arkansas, sendo resistente a temperaturas em torno de -17°C (MOORE; SKIRVIN, 1990; ANTUNES; RASEIRA, 2004).

A planta é muito precoce e produtiva, moderadamente vigorosa e hastes muito eretas e com espinhos (Figura 2a). Em Pelotas (RS), a maturação inicia-se em meados de novembro, estendendo-se até meados ou mesmo final de dezembro, os frutos são de tamanho médio (Figura 2b), com peso variável entre 4 a 7 g (mas, com a maioria entre 3 e 4 g), com sabor agradável (acidez acentuada) e sólidos solúveis entre 7 e 8 °Brix. A necessidade de frio é estimada entre 400 a 500 horas (ANTUNES; RASEIRA, 2004).

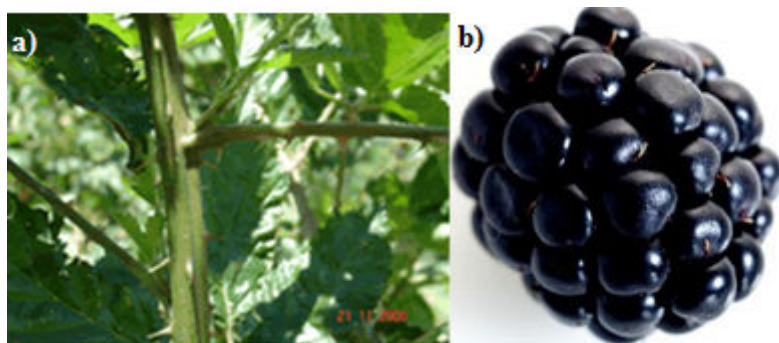


Figura 2. Hastes (a) e fruto (b) da amoreira-preta ‘Brazos’

Fonte:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amora/SistemaProducaoAmoreiraPreta/botanica.htm>, 2008.

3.1.2.3 ‘Arapaho’

É uma cultivar de maturação mediana a precoce, apresentam hastes sem espinhos (Figura 3a) e com boa qualidade de fruta. Foi desenvolvida na Universidade de Arkansas e é originária de hibridação entre as seleções Ark. 631 por Ark. 883 (ambas genitores heterozigotos para genes de ação recessiva para o caráter ausência de espinhos, derivados de cruzamento entre ‘Merton Thornless’ x ‘Thornfre’).



Figura 3. Hastes (a) e frutos (b) da amoreira-preta ‘Arapaho’

Fonte:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amora/SistemaProducaoAmoreiraPreta/botanica.htm>, 2008.

O cruzamento que originou a ‘Arapaho’ foi realizado em 1982, a planta matriz selecionada em 1985 e testada como Ark. 1536. A Universidade de Arkansas detém a patente

desta cultivar. De acordo com a descrição encontrada no livro de *Register of New Fruit & Nut Variety*, os frutos tem tamanho médio, firme, cor preta brilhante, forma cônica (Figura 3b) e com sementes pequenas. A planta é produtiva, moderadamente vigorosa e muito ereta. As frutas são bastante saborosas e apresentam um alto teor de sólidos solúveis (ANTUNES; RASEIRA, 2004).

3.1.2.4 ‘Choctaw’

É também originária do Programa de Melhoramento da Universidade de Arkansas, proveniente de hibridação realizada entre ‘Darrow’ x ‘Brazos’, em 1975. Foi patenteada sob número 6678 (US patent 6678), sendo detentora aquela Universidade. As hastes são eretas (Figura 4a), muito produtivas e facilmente produzem hastes a partir de estacas de raiz. É considerada imune à ferrugem e resistente à antracnose, moderadamente suscetível a oídio e suscetível a enrosetamento. É resistente ao frio hibernal. As frutas são firmes, cônicas e com sementes pequenas (Figura 4b). Nas condições de Pelotas, RS, os frutos apresentam tamanho médio (em torno de 5 g de peso médio), sabor doce ácido, predominando acidez, e os sólidos solúveis variam entre 8,2 °Brix a 9,6 °Brix. A plena floração ocorre, geralmente, no início de outubro e a maturação na terceira semana de novembro (ANTUNES; RASEIRA 2004).

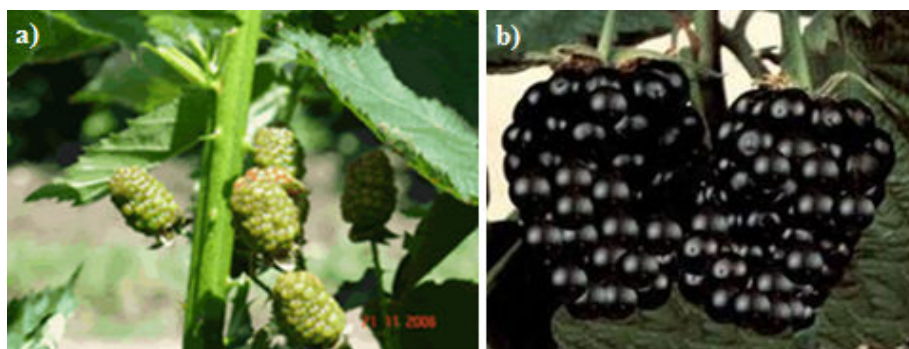


Figura 4. Hastes (a) e frutos (b) da amoreira-preta ‘Choctaw’

Fonte:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amora/SistemaProducaoAmoreiraPreta/botanica.htm>, 2008.

3.1.2.5 ‘Guarani’

É originária de sementes introduzidas da Universidade de Arkansas, nos Estados Unidos. Foi selecionada no Brasil a partir de cruzamento realizado nos EUA (Arkansas) entre as variedades ‘Lawton’ x (‘Darrow’ x ‘Brazos’) x (‘Shaffer Tree’ x ‘Brazos’). É uma planta de porte ereto, hastes com espinhos (Figura 5a), vigorosa, produz frutos de coloração preta, tamanho médio (5 g), firme, com película resistente (Figura 5b), forte aroma. Durante quatro anos de avaliação, na região de Pelotas (RS), produziu 3,6 kg/planta/ano. É recomendado para o consumo *in natura* e industrialização (SANTOS; RASEIRA, 1988).

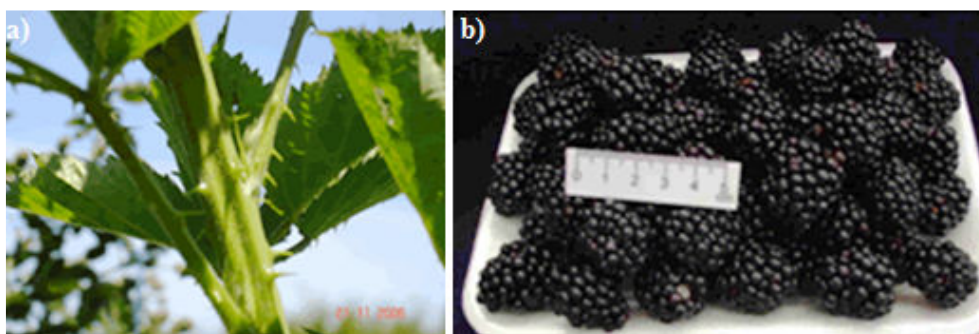


Figura 5. Hastes (a) e frutos (b) da amoreira-preta ‘Guarani’

Fonte:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amora/SistemaProducaoAmoreiraPreta/botanica.htm>, 2008.

As frutas são de sabor doce-ácido, sendo um pouco mais ácido que doce. O teor de sólidos solúveis varia de 8 a 10 °Brix (ANTUNES; RASEIRA 2004). Pode ser consumida ao natural ou processada. No primeiro ano pós-plantio, no estado de Minas Gerais, a produtividade pode chegar a 12 t ha⁻¹ e, no segundo ano, 22 t ha⁻¹ (GONÇALVES et al., 2011).

3.1.3 Produção, comercialização e consumo

A produção mundial de amora-preta é bem menor comparada com a de outras pequenas frutas (RODRÍGUEZ; JUAREZ, 1995). Segundo Clark (2006), vários fatores contribuem para o aumento na produção de frutos de amoreira-preta, incluindo cultivares com maior vida de prateleira, melhor qualidade, melhor adaptação, sem espinhos, entre outras

características; maior interesse devido aos seus benefícios à saúde; aumento de tecnologias de plantio e manejo, particularmente em áreas de frio ameno, e também devido a melhores técnicas pós-colheita e equipamento que permitem a expansão do mercado *in natura*, expandido as vendas.

Em 2011 os principais estados produtores no Brasil foram o Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, sendo a área total estimada em 450 hectares e produção anual de 150 toneladas (GONÇALVES et al., 2011). No Rio Grande do Sul, principal estado produtor, destacou-se o município de Vacaria com área plantada total de vinte hectares (PAGOT, 2006). Em São Paulo podem ser encontrados cultivos localizados em Campos do Jordão, São Bento do Sapucaí e Santo Antônio do Pinhal. Embora sejam escassos dados oficiais sobre área plantada e volume produzido, é notável o crescente interesse pela cultura por parte dos produtores decorrente da grande procura pela população.

Os frutos são consumidos *in natura*, mas podem ser processados, sendo utilizados na produção de polpa congelada, liofilizada ou na forma de suco concentrado. Na indústria, são utilizados para a produção de suplementos dietéticos, sorvetes, doces, geleias, confeitos e outros (KAFKAS et al., 2006).

3.1.4 Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta

A amora-preta é um fruto não-climatérico, e além do consumo *in natura*, a amora-preta é destinada à produção de polpa, geléias e sucos naturais (BASSOLS; MOORE, 1981b). Em razão da rápida perda de qualidade pós-colheita há uma grande limitação quanto ao atendimento do mercado de frutas frescas (PERKINS-VEAZIE et al., 1999).

O conhecimento da fisiologia pós-colheita do fruto é de grande importância para que se tenham subsídios técnicos que visem à ampliação do tempo de armazenamento sem, contudo, alterar suas características físicas, sensoriais e nutricionais, especialmente no caso da amora-preta, pela fragilidade de seus frutos (ABREU et al., 1998).

Por sua estrutura frágil e alta taxa respiratória, os frutos de amoreira-preta apresentam vida pós-colheita relativamente curta (MORRIS et al., 1981). A firmeza dos frutos colhidos influencia na vida de prateleira, pois podem ser facilmente danificados no manuseio, facilitando infecções por patógenos (PERKINS-VEAZIE et al., 1997). A recomendação usual de armazenamento refrigerado em relação à amora-preta é de dois a três dias, quando

mantidas a 0 °C. Contudo, estudos mostraram que quando armazenadas à temperatura de 5 °C, as cultivares Cheyenne, Choctaw, Shawnee e Navaho mantiveram-se com qualidade durante sete dias (PERKINS-VEAZIE et al., 1993; PERKINS-VEAZIE; COLLINS, 1996).

Na conservação de frutas em pós-colheita, várias técnicas podem ser utilizadas, tais como armazenamento em atmosfera modificada pelo uso de filmes e ceras, armazenamento em atmosfera controlada, armazenamento sob baixa temperatura, utilização de reguladores de crescimento e uso de irradiação (CARVALHO, 1994).

O armazenamento a frio retarda processos fisiológicos, como respiração e produção de calor vital, relacionados à senescência das frutas. A redução da intensidade respiratória reduz as perdas de aroma, sabor, cor, textura e outros atributos de qualidade do produto armazenado (FILGUEIRAS et al., 1996).

Embora a refrigeração se apresente como uma prática eficiente para redução das perdas pós-colheita, o armazenamento em atmosfera modificada ou controlada pode trazer melhores benefícios, quando usado adequadamente. Na obtenção de atmosferas modificadas, são utilizados filmes de polietileno de baixa densidade com diferentes espessuras, ou filmes de cloreto de polivinila (PVC), mais delgados e mais permeáveis do que os de polietileno, sendo, em alguns casos, mais eficientes para prolongar a vida útil das frutas (CHITARRA; CHITARRA, 2005), como já observado em goiabas armazenadas (LIMA; DURIGAN, 2000).

A amora-preta apresenta alta taxa respiratória (Tabela 1) e elevada produção de etileno (MORRIS et al., 1981). A produção de etileno em amoras varia entre 0,1 $\mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ a 1 $\mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ a 5 °C conforme a cultivar, sendo que sua remoção do ar da câmara frigorífica ajuda no controle de doenças (MITCHAM et al., 2007).

Tabela 1. Taxa respiratória de amora-preta, expressa em produção de dióxido de carbono ($\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) a várias temperaturas

Temperatura (°C)	$\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$
0	18-20
4-5	31-41
10	62
15-16	75
20-21	100-130

Fonte: MITCHAM et al., 2007.

Devido à rápida perda de qualidade pós-colheita, há grande limitação quanto ao mercado de frutos *in natura* (PERKINS-VEAZIE et al., 1999). Portanto, é de grande

importância a utilização de técnicas que ampliem o tempo de armazenamento sem, contudo, alterar suas características físicas, organolépticas e nutricionais (ABREU et al., 1998).

O pré-resfriamento é a primeira etapa a ser realizada no manejo pós-colheita. Tem como finalidade a remoção rápida do calor do campo dos produtos recém-colhidos, antes do transporte, armazenamento ou processamento. O método recomendado para pequenos frutos, como amora-preta, é o pré-resfriamento por ar forçado, pois estas não suportam o pré-resfriamento com água, uma vez que a imersão dos frutos em soluções aquosas pode comprometer a integridade dos tecidos de proteção dos mesmos, aumentando a atividade respiratória, a perda de água por transpiração e a incidência de podridões (MITCHAM et al., 2007).

Depois da colheita, os frutos continuam os processos fisiológicos por tempo considerável (SALUNKHE; DESAI, 1984). O armazenamento refrigerado é o método mais eficaz utilizado para manutenção da qualidade pós-colheita de frutos e consiste em remover e minimizar a geração de calor (energia) do produto a ser conservado, através da diminuição da intensidade da atividade respiratória, produção de etileno e ação das enzimas degradativas e oxidativas (CHITARRA; CHITARRA, 2005), permitindo redução no metabolismo normal, sem alterar sua fisiologia, condições nas quais o armazenamento pode ocorrer por maior espaço de tempo, sem perda apreciável de seus atributos de qualidade (MOSCA, 1992).

Outra influência do armazenamento refrigerado está relacionada à estabilidade dos compostos fenólicos e antioxidantes (PILJAC-ZAGARAC; SAMEC, 2010). O período e a temperatura de armazenamento, bem como seus efeitos no fruto variam de espécie para espécie (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Em amora-preta, a recomendação usual de armazenamento refrigerado é de 2 a 3 dias, quando mantidas a 0 °C. Contudo, quando armazenadas à temperatura de 5 °C, as frutas das cultivares Cheyenne, Choctaw, Shawnee e Navaho mantiveram-se com qualidade durante sete dias (PERKINS-VEAZIE et al., 1993; PERKINS-VEAZIE; COLLINS, 1996).

3.1.5 Armazenamento com atmosfera modificada

Armazenamento em atmosfera modificada é utilizado quando a composição da atmosfera de armazenamento não é hermeticamente fechada, tal como na utilização de filmes plásticos, onde ocorrem alterações da composição da atmosfera (N₂, O₂, CO₂, C₂H₄, etc.) voluntariamente ou involuntariamente (WILLS, 1998). São utilizadas embalagens plásticas de

permeabilidade limitada ao gás carbônico (CO_2) e oxigênio (O_2), causando modificação da concentração de gases no interior da embalagem. O material normalmente utilizado são filmes de polietileno de baixa densidade, com diferentes espessuras, e de cloreto de polivinila (PVC) (BOTREL, 1994).

Para o armazenamento de amora-preta sob atmosfera modificada, é recomendado de 10 a 20% de CO_2 e 5 a 10% de O_2 para reduzir podridões e perda de firmeza da polpa (WRIGHT; KADER, 1997). Mas o grau de resposta as condições de atmosfera modificada depende da cultivar e das condições de manejo (MITCHAM et al., 2007). Antunes et al. (2003) observaram aumento do percentual de solubilidade de pectina e pectina solúvel, ocorrendo redução de pectina total e compostos fenólicos totais em amoras ‘Brazos’ e ‘Comanche’ conservadas sob atmosfera modificada em diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. As cultivares Brazos e Comanche conservaram-se melhor em armazenamento refrigerado a 2 °C, sendo mantidas com qualidade até nove dias após a colheita.

De acordo com Jerônimo; Kanesiro (2000), o uso de atmosfera modificada durante o armazenamento pode reduzir as desordens ocasionadas pela respiração e pela transpiração, como perda de massa e mudança na aparência. A atmosfera modificada, quando utilizada corretamente, torna-se eficiente em retardar o metabolismo e manter a qualidade do produto por períodos prolongados de armazenamento (CHEN et al., 2000)

Ben-Yehoshua (1987), ressalta que o recobrimento dos frutos com filmes à base de polietileno ou cloreto de polivinila, aumenta a resistência a passagem de vapor de água, produzindo uma atmosfera interna com alta umidade relativa, exercendo desta forma um efeito protetor sobre os frutos aliviando os efeitos da perda de água por transpiração na pós-colheita, que é o fator que mais compromete a qualidade do fruto. Esse autor afirmou ainda que uma das principais vantagens da embalagem com filmes é que eles estão em contato direto com a superfície do fruto, de forma que as temperaturas deste e da embalagem devem ser a mesma. Isto deve eliminar os problemas de condensação e umidade excessiva que podem levar ao aparecimento de fungos e desordens fisiológicas mais acentuadas.

A composição da atmosfera interna ao redor do produto depende das características de permeabilidade do material da embalagem e da velocidade de consumo ou liberação de gases pelo produto. O filme deve permitir a entrada de O_2 para dentro da embalagem, na mesma velocidade em que é consumida pela respiração, e o mesmo deve ocorrer com a saída de CO_2 da embalagem para o exterior, em relação ao que é produzido pelo produto, pois seu acúmulo poderá provocar distúrbios fisiológicos (SARANTÓPOULOS, 1996).

De acordo com Rodriguez-Giro (1994), um filme ideal deve ter permeabilidade ao CO₂ de 3 a 5 vezes maior que ao O₂, para que se alcance equilíbrio. Para a modificação da atmosfera de frutas e hortaliças, geralmente são utilizados filmes sintéticos como o polietileno de baixa densidade, policloreto de vinil e polipropileno (KADER, 1992).

3.1.6 Cultivo de amoreiras em regiões subtropicais

As amoreiras podem ser cultivadas em diversas condições de climas, porém com comportamentos distintos em função da amplitude térmica, das altas e baixas temperaturas, incidência de intervenções climáticas e baixa precipitação. Como o clima está diretamente relacionado com a altitude, em algumas áreas tropicais de altitude o clima pode ser semelhante àquele de áreas temperadas e, assim, cultivares podem ser adaptadas, desde que não sejam influenciadas por outros fatores, como por exemplo, comprimento do dia (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

O Oeste do Paraná apresenta condições climáticas propícias ao cultivo de amoreiras pretas com menos exigência em frio e apresenta vantagens como a antecipação da colheita em relação à dos demais Estados produtores, como Rio Grande do Sul e região serrana de Santa Catarina, em decorrência do clima hibernal mais quente, seguido de temperaturas amenas ao final do inverno e elevada na primavera; além da maior interceptação da radiação solar que resulta em frutos de maior qualidade (PIO; CHAGAS, 2008). A luminosidade afeta o tamanho, o brilho e também o desenvolvimento da coloração, por afetar a síntese de pigmentos, bem como, a composição química em geral dos frutos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

As mesmas condições climáticas de altitude que favorecem o cultivo de espécies de clima frio favorecem também a ocorrência de granizo, com prejuízos significativos aos produtores (YURI, 2003). Segundo Pagot (2006), as geadas precoces, de primavera, comuns nas regiões frias de altitude do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, podem afetar a primeira floração, sendo importante a escolha de cultivares com florações mais tardias, desde meados de outubro e início de novembro para plantio nessas regiões.

Como planta que necessita de frio, os aspectos fenológicos das amoreiras podem variar de ano para ano, em função desta exigência em frio ter sido ou não satisfeita. Mesmo sendo o Oeste do Paraná uma região potencialmente apta ao cultivo da planta, a recomendação de uma espécie ou cultivar num dado local depende do conhecimento do

comportamento desta em relação aos aspectos edafoclimáticos. Segundo Antunes (1999) os estudos acerca dos aspectos fenológicos e produtivos de cultivares de amoreira-preta, espécie enquadrada no rol das pequenas frutas, são relativamente demorados, entretanto, somente a partir deles é que se têm indicações corretas sobre o comportamento da cultivar a ser recomendada.

De acordo com Wielgolaski (1974), a fenologia refere-se ao estudo dos efeitos ambientais sobre o ciclo biológico das plantas, especialmente dos órgãos vegetativos e reprodutivos. O conhecimento da fenologia da planta é um fundamento básico essencial na busca de novas tecnologias para o sistema de produção de qualquer cultura e contribui para diminuir os riscos de insucesso quando se pretende cultivar comercialmente espécies pouco conhecidas. A observação fenológica, obtida de forma sistemática, reúne informações sobre o estabelecimento de espécies, o período de crescimento, o período de reprodução e a disponibilidade de recursos alimentares, que podem estar associados às mudanças na qualidade e à abundância de recursos, como luz e água (MORELLATO; LEITÃO-FILHO, 1992).

3.2 Composição Nutricional

A composição química dos frutos varia em função da cultivar, condições de crescimento, estágio de maturação, colheita e também do armazenamento (TALCOTT, 2007). Além de compostos fenólicos, as amoras são ricas em carboidratos e diversas vitaminas essenciais e minerais. A Tabela 2 apresenta a composição nutricional da amora-preta.

Os principais açúcares são glicose, frutose e sacarose, sendo que suas proporções são diferentes entre as cultivares. Os teores de glicose e frutose podem variar de aproximadamente 3.240 - 2.880 e 810 - 1.170 mg 100 g⁻¹ (peso fresco) glicose para frutose. O conteúdo de sacarose é estimado em 240 mg 100 g⁻¹ (peso fresco) (FAN-CHIANG; WROLSTAD, 2010). Os níveis de glicose, frutose, açúcares totais e sólidos solúveis aumentam acentuadamente quando o fruto amadurece, ou seja, quando o fruto passa da coloração vermelha para a roxa azulada escura (ACOSTA-MONTOYA et al., 2010).

Os frutos de amoreira-preta possuem o ácido málico como principal ácido orgânico (KAFKAS et al., 2006). Fan-Chiang; Wrolstad (2010) relataram as seguintes médias de ácidos orgânicos não voláteis de 52 amostras de amoras: 280 mg 100 g⁻¹ (peso fresco) de ácido málico; 293 mg 100 g⁻¹ (peso fresco) de ácido lactoisocítrico; 599 mg 100 g⁻¹

(peso fresco) de ácido isocítrico; e 572 mg 100 g⁻¹ (peso fresco) de ácido cítrico (FAN-CHIANG; WROLSTAD 2010). Além disso, vestígios de chiquímico, cumárico e succínio foram identificados.

Tabela 2. Composição química de amora-preta

Composição					
Água (g)	88,20	Vitaminas		Minerais	
Energia (kcal)	43,00	Ácido ascórbico total (mg)	21,00	Cálcio (mg)	29,00
Proteínas (g)	1,39	Tiamina (mg)	0,02	Ferro (mg)	0,62
Lipídios (g)	0,49	Riboflavina (mg)	0,03	Magnésio (mg)	20,00
Cinzas	0,37	Niacina (mg)	0,65	Fósforo (mg)	22,00
Carboidratos	9,61	Ácido pantotênico (mg)	0,28	Potássio (mg)	162,00
Fibras	5,30	Vitamina B6 (mg)	0,03	Sódio (mg)	1,00
Açúcares	4,88	Folato total (µg)	25,00	Zinco (mg)	0,53
Sacarose	0,07	Vitamina B12 (µg)	nd*	Cobre (mg)	0,17
Glicose	2,31	Vitamina A (IU)	214,00	Manganês (mg)	0,65
Frutose	2,40	α-tocoferol (mg)	1,17	Selênio (mg)	0,40
Maltose	0,07	β-tocoferol (mg)	0,04		
Galactose	0,03	γ-tocoferol (mg)	1,34		
Amido	nd*	Δ-tocoferol (mg)	0,90		
		Vitamina K (µg)	19,80		

Fonte: U.S.D.A. - Banco de dados do Departamento de Agricultura e Nutrientes dos Estados Unidos, 2010. *nd: não detectado.

Os ácidos orgânicos presentes em amoras são importantes para a estabilização de antocianinas e ácido ascórbico, e também para aumentar a vida de prateleira dos frutos frescos ou processados. Outro índice importante é a relação entre sólidos solúveis e a acidez titulável. Esta proporção aumenta conforme o amadurecimento do fruto da cor roxa para roxa azulada escura, refletindo o grande aumento de açúcares e redução de ácidos orgânicos (ACOSTA-MONTOYA et al., 2010).

Os frutos ainda contêm hidrolases na parede celular e enzimas oxidase, como polifenoloxidase e peroxidase, que contribuem para a deterioração da qualidade dos frutos. A atividade enzimática resulta em perda da textura dos frutos, formação de pigmentos marrons e a destruição de fitoquímicos que afetam a sua aceitabilidade e, particularmente, os frutos frescos. A refrigeração, a redução de oxigênio, a adição de enzimas inibidoras, modificação do pH e a adição de agentes redutores para controlar a oxidação secundária são algumas das técnicas utilizadas atualmente para controlar a atividade enzimática (TALCOTT, 2007).

3.3 Compostos Fenólicos

O metabolismo secundário nos vegetais produz uma variedade de compostos orgânicos que não possuem distribuição universal, ou seja, são restritos a espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas, enquanto que os metabólitos primários são encontrados em todo o reino vegetal. Essas substâncias não apresentam função direta em seu crescimento e/ou desenvolvimento, atuando principalmente em defesa vegetal contra ataque de patógenos. A função dos metabólitos secundários foi durante muito tempo desconhecida nos vegetais sendo considerado apenas como produtos finais do metabolismo ou resíduos sem função aparente. Os estudos dessas substâncias foram iniciados pelos químicos orgânicos, demonstrando funções contra herbivoria, ataque contra patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes, microrganismo simbiotes, estresses abióticos (conteúdo de água, níveis de luminosidade, exposição à luz ultravioleta e deficiência de minerais) (BENNET; WALLSGROVE, 1994; CASTRO et al., 2005). Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos.

Compostos fenólicos são importantes constituintes de muitas frutas e hortaliças sendo que a quantificação dessas substâncias revela informações a respeito da atividade antioxidante, qualidade do alimento e dos potenciais benéficos à saúde (TALCOTT, 2007). Estando largamente distribuídos no reino vegetal, os compostos fenólicos fazem parte da dieta humana de forma significativa, influenciando fortemente a qualidade dos frutos, pois contribuem para seus atributos sensoriais e nutricionais (SCALZO et al., 2005).

Os compostos fenólicos são caracterizados por uma estrutura aromática, com uma hidroxila (Figura 6), ou mais, como grupo funcional. Estes grupos funcionais podem ser substituídos por ésteres, ésteres metílicos e glicosídeos. São facilmente oxidáveis, tanto por meio de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, luz, calor ou em meio alcalino, ocasionando o escurecimento de soluções ou compostos isolados (SIMÕES, 2001).

Os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos: alguns solúveis em água e existem aqueles que são grandes polímeros insolúveis. Esses compostos podem ser agrupados em diferentes classes de acordo com sua estrutura química básica e em diferentes subclasses com substituições específicas na estrutura básica, associação com carboidratos e formas polimerizadas (FARAH; DONANGELO, 2006).

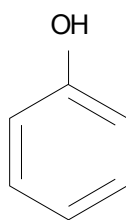


Figura 6. Estrutura química de um fenol simples

Fonte: BRAVO, 1998.

Os compostos fenólicos são encontrados em todas as partes dos vegetais, mais distribuídos em quantidades diferentes em cada uma delas, podendo variar em diferentes populações de uma mesma espécie. O tipo e variedade de polifenóis variam com o estágio de desenvolvimento da planta, grau de maturação, condições ambientais, solo, manejo, processamento e armazenamento da matéria-prima e devido à sua diversidade química, os compostos fenólicos apresentam uma variedade de funções nos vegetais. A biossíntese pode ocorrer por meio de diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese de compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico (Figura 7) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota da pentose fosfato em aminoácidos aromáticos (HERRMANN; WEAVER, 1999). A classe mais abundante de compostos fenólicos secundários em plantas é derivada da fenilalanina, por meio da eliminação de uma molécula de amônia para formar o ácido cinâmico. Essa reação é catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), a qual se situa em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e o secundário, de forma que a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos. A atividade dessa enzima é aumentada por fatores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, luz e infecção por patógenos (LICHTENTHALER, 1999).

A estrutura química dos compostos fenólicos determina sua capacidade de atuar como sequestradores de radicais livres. O tipo de composto, o grau de metoxilação e o número de hidroxilas são alguns dos parâmetros que determinam esta atividade antioxidante, possibilitando atuarem como agentes redutores, exercendo proteção ao organismo contra o estresse oxidativo. Estas características desempenham papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e na quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de

iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (GÓMEZ-RUIZ et al., 2007).

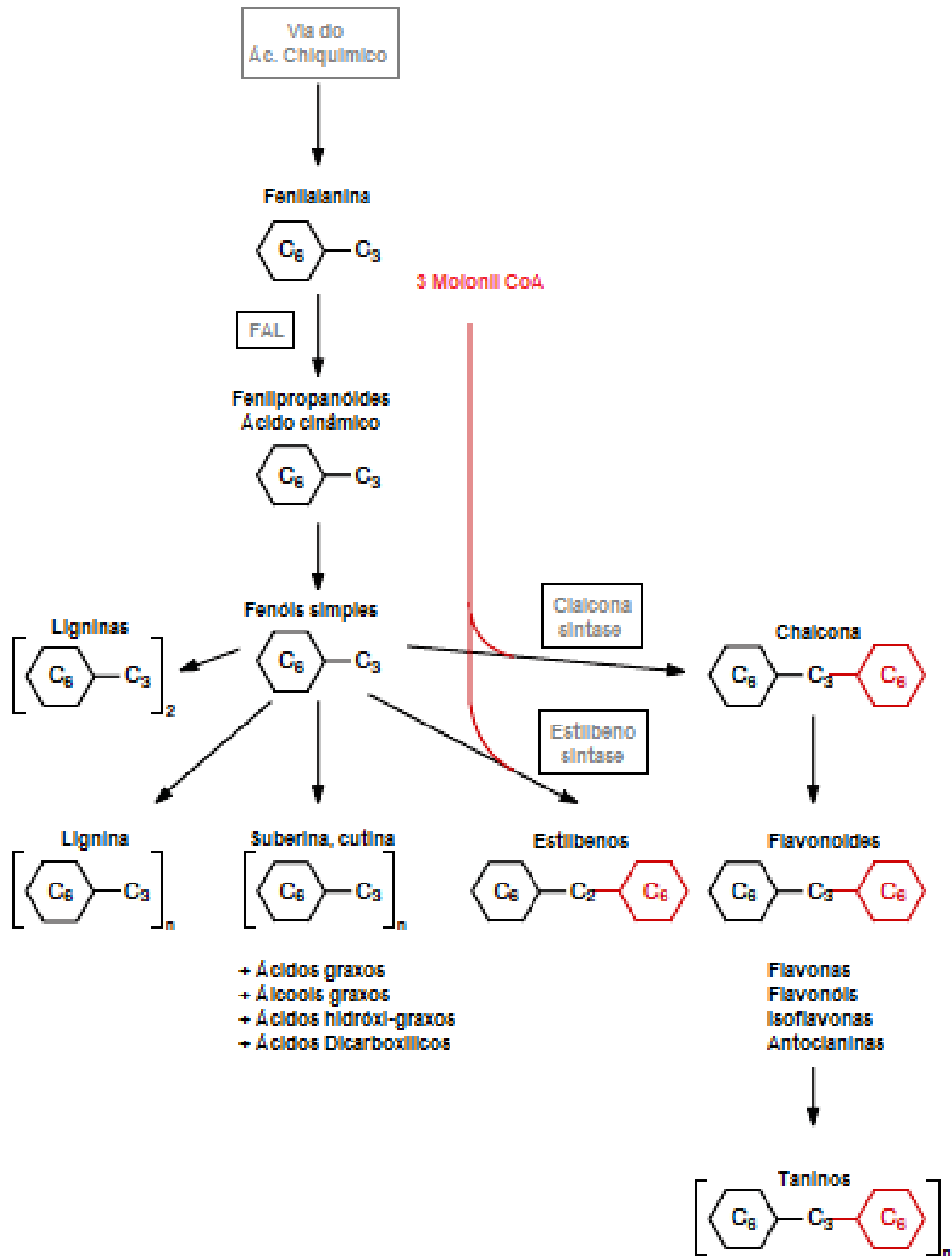


Figura 7. Metabolismo de compostos fenólicos: rota do ácido chiquímico e do ácido malônico

Fonte: HELDT, 2005.

Os vegetais podem modificar os esqueletos carbônicos básicos de compostos fenólicos simples para formar produtos mais complexos da mesma forma como fazem com outros produtos secundários. Muitos fenólicos simples apresentam funções importantes nos vegetais, agindo como compostos de defesa contra patógenos e herbivoria (TAIZ; ZEIGER, 2009). Na Tabela 3 encontram-se algumas das principais classes de compostos fenólicos em plantas, de acordo com o número de carbonos.

Tabela 3. Classificação dos compostos fenólicos em plantas

Estrutura	Classe de compostos fenólicos
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas, benzofenonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides, isoflavonoides e chalconas
(C6-C3) ₂	Lignanais
(C6-C3-C6) ₂	Diflavonoides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

Fonte: OLDINI, 2007.

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. Esta atividade, por sua vez, dependerá da estrutura química do composto, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais) (OLDINI, 2007).

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998). Ribéreau-Gayon (1968) adotou a seguinte classificação para estes compostos: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza.

Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza, estes apresentam-se em número reduzido, embora sejam encontrados com frequência. Neste grupo

estão os fenóis simples (pirocateol, hidroquinona e o resorcinol) e os aldeídos derivados dos ácidos benzoicos, constituintes dos óleos essenciais (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

Os polímeros são compostos fenólicos que não se apresentam em forma livre nos tecidos vegetais, representados pelos taninos e ligninas. Os taninos são compostos de alto peso molecular, baseados em seu tipo estrutural: taninos hidrolisáveis (ácido gálico) e taninos condensados (catequina e leucoantocianidina). As ligninas são polímeros complexos de grande rigidez e resistência mecânica e sua hidrólise alcalina libera uma grande variedade de derivados dos ácidos benzoicos e cinâmico (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados em todo o reino vegetal. Estes fenólicos estão divididos em dois grandes grupos: ácidos fenólicos ou não flavonoides (ácidos hidróxibenzoicos, ácidos hidróxicinâmico e seus derivados) e os flavonoides (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

Amoras são ricas em polifenóis, incluindo antocianinas, elagitaninos, flavonois, flavanois e procianidinas (WU et al., 2006; BUSHMAN et al., 2004; CHO et al., 2005; GU et al., 2004). Os frutos também contém níveis apreciáveis de ácidos fenólicos e baixos níveis de lignanas (HOWARD; HAGER, 2007; MAZUR et al., 2007). Estudos indicam que os teores de compostos fenólicos totais têm variado entre 114-1056 mg 100 g⁻¹ (peso fresco). Além da genética, a maturação pode influenciar nos níveis de fenóis totais nos frutos (SELLAPPAN et al., 2002).

3.3.1 Ácidos fenólicos ou não flavonoides

Os não-flavonoides são compostos benzoicos e cinâmicos, chamados comumente de ácidos fenólicos, que contêm um anel aromático com menos um grupo hidroxila e com diferentes grupos funcionais: aldeídos, álcoois ou ácidos; que podem formar ésteres com os ácidos orgânicos ou unir-se a açúcares. Outros compostos de natureza fenólica são os estilbenos, lignanos e, de forma polimerizada, os taninos e ligninas. Algumas das propriedades dos vegetais (como a cor, a adstringência e o aroma) são devidas aos compostos fenólicos (MANACH et al., 2004).

Ácidos hidróxibenzóicos

Apresentam uma estrutura básica C6-C1. Caracterizam-se pela hidroxilação do carbono 4 do ácido benzoico (neste ácido R1 e R2 são substituídos por H). São os compostos fenólicos de estruturas mais simples e os mais representativos em termos de ocorrência e variedade. Desempenham funções biológicas vitais para as plantas, tais como germinação de sementes e crescimento. O ácido hidroxibenzóico mais comum é o ácido gálico (caracteriza-se pela substituição de R1 e R2 por hidroxilas) (Figura 8).

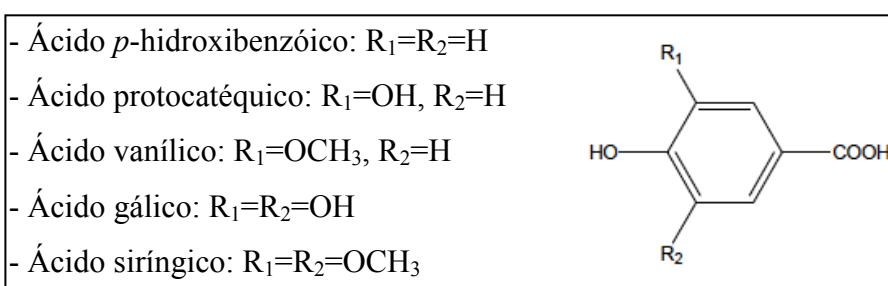


Figura 8. Estrutura química dos principais ácidos hidroxibenzóicos

Fonte: LIMA et al., 2008.

Ácidos hidroxicinâmicos

Apresentam estrutura básica C6-C3 e por isso são também conhecidos como fenilpropanóides (Figura 9). Caracterizam-se pela hidroxilação do carbono 4 do ácido cinâmico (neste ácido R1 e R2 são substituídos por H). Os mais representativos são os ácidos *p*-cumárico, caféico, felúrico e sinápico. As funções biológicas vitais associadas a esta classe de compostos são: inibição da germinação e do crescimento de plantas, bem como atividades antibióticas.

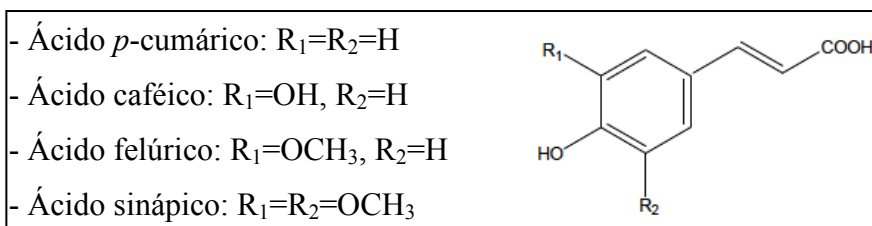


Figura 9. Estrutura química dos principais ácidos hidroxicinâmicos

Fonte: LIMA et al., 2008.

A atividade antioxidante dos derivados dos ácidos hidrocinâmicos é maior do que a dos ácidos hidroxibenzóicos. A presença do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ na estrutura do ácido cinâmico aumenta sua capacidade de estabilizar radicais. Provavelmente, ocorre a conjugação da dupla ligação do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ com as ligações duplas do anel (RICE-EVANS et al., 1996).

Os principais ácidos fenólicos encontrados em frutos de amora são o ácido hidroxibenzóico e os ácidos hidroxicinâmicos. Estes ácidos raramente aparecem como ácidos livres, eles ocorrem de forma conjugada de ésteres e glicosídeos (HOWARD; HAGER, 2007). Os ésteres constituem 53,1% do total de ácidos fenólicos, enquanto que glicosídeos e ácidos livres representam 43,6% e 3,3%, respectivamente. Os ácidos hidrobenczóicos incluem *p*-hidrobenczóico, protocatecuico, gálico, vanílico, salicílico e ácido gentísico. Glicosídicas e éster na forma de ácido salicílico são os mais comuns (ZADERNOWSKI et al., 2005).

Cafeico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, e ácido ferúlico são os ácidos hidroxicinâmicos encontrados livres em amoras, na forma glicosídica e éster. Na forma de éster, *m*-cumárico, 3,4-dimetoxicinâmico e hidroxicafeico são os ácidos predominantes (ZADERNOWSKI et al., 2005). Os ácidos derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico encontrados nos frutos de amoreira-preta foram classificados como: ácido clorogênico, ácido neoclorogênico, éster de glicose cafeico, *p*-cumárico, felúrico, e ácido gálico, bem como o ácido protocatecuico e o β -D-glicosídeo de *p*-cumárico e ácido hidroxibenzóico (SCHUSTER; HERMANN, 1985).

O ácido elágico é um ácido hidroxibenzóico, mas a maior parte do ácido elágico encontrado em amoras ocorre na forma de elagitaninos, que é uma classe diferente de compostos fenólicos. Os elagitaninos são medidos, como equivalentes de ácido elágico, e alguns estudos indicam que seus teores variam, sendo encontrados valores de 2 a 90 mg 100 g⁻¹, todos baseados no peso fresco (SIRIWOHARN et al., 2004; ZADERNOWSKI et al., 2005; SIRIWOHARN et al., 2005; GONZÁLEZ; BEGONA, 2003; SELLAPPAN et al., 2002; WADA; OU, 2002). Redução dos derivados do ácido elágico foram encontrados em amora-preta, com valores de 30 mg 100 g⁻¹ do peso fresco em frutos vermelhos, e 20 mg 100 g⁻¹ do peso fresco para frutos pretos (ACOSTA-MONTOYA et al., 2010).

3.3.2 Flavonoides

A presença e distribuição de flavonoides nos vegetais dependem de fatores como ordem e família do vegetal, bem como da variação das espécies. São sintetizados a partir da combinação de derivados sintetizados a partir da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético. Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente de raios ultravioleta, pois a formação dos flavonoides é acelerada pela luz. Conseqüentemente, em plantas cultivadas em estufas, onde raios ultravioleta são bloqueados, o conteúdo de flavonoides é reduzido; assim como os vegetais que crescem na Espanha ou na África do Sul são apontados como contendo de 4 a 5 vezes mais flavonoides que os que crescem no Reino Unido (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004).

As frutas, principalmente as que apresentam a coloração vermelha e/ou azul, são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares. Estas cores são características das antocianinas, que são compostos fenólicos pertencentes a classe dos flavonoides. Muitos destes compostos apresentam uma gama de efeitos biológicos, incluindo ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora. Estes compostos fenólicos apresentam diversas funções de defesa para as plantas, não somente contra agentes do meio ambiente (luz, temperatura e umidade), mas também para fatores internos, contribuindo para a síntese e diferenças genéticas, de nutrientes e de hormônios (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004). As antocianinas são pigmentos muito instáveis, podendo ser degradadas durante o processamento e a estocagem com conseqüente alteração da cor (BOBBIO; BOBBIO, 1995).

Os flavonoides constituem a maior classe de fenólicos vegetais e são os pigmentos mais comuns depois da clorofila e dos carotenóides. Ocorrem geralmente em plantas como derivados glicosilados e seu papel fisiológico é diverso. Devido as suas cores atrativas, flavonas, flavonois e antocianidinas contribuem como sinais visuais para os insetos durante a polinização. Além disso, a adstringência da catequina e outros flavonois podem representar um sistema de defesa contra insetos nocivos às plantas. Agem também como catalisadores da fotossíntese e reguladores dos canais de íons envolvidos na fosforilação. Protegem células vegetais de espécies reativas de oxigênio produzidas pelo sistema de transporte de elétrons fotossintético e, por apresentarem propriedades absorptivas de ultravioleta, protegem as plantas contra a radiação ultravioleta do sol (STALIKAS, 2007).

Estruturalmente, os flavonoides constituem compostos de baixo peso molecular, consistindo de 15 átomos de carbono, contendo um esqueleto comum de difenilpiranos ($C_6-C_3-C_6$), compostos por anéis fenil ligados através de um anel pirano (heterocíclico). A atividade dos flavonoides como agentes antioxidantes depende da propriedade redox de seus grupos hidrofênicos e da relação estrutural entre as diferentes partes da estrutura química. Esta estrutura básica permite uma magnitude de padrões e substituições e variações no anel pirano, que resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonois, flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas (ANGELO; JORGE, 2007).

A presença de grupos hidroxilas e açúcares aumentam a solubilidade em água dos flavonoides, e de outros substituintes, tais como éteres metílicos ou unidades de isopentil modificadas, tornam os flavonoides lipofílicos (hidrofóbicos). Os tipos diferentes de flavonoides desempenham diversas funções nos vegetais, incluindo pigmentação e defesas. De acordo com suas características químicas e biossintéticas, os flavonoides são separados em diversas classes: flavonas, flavonois, dihidroflavonoides (flavonas e flavononóis), antocianidinas, isoflavonoides, auronas, neoflavonoides, biflavonoides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas e podem ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (OLDINI, 2007; STALIKAS, 2007).

Devido à grande diversidade estrutural, os possíveis benefícios à saúde de uma dieta com alimentos ricos em compostos fenólicos dependem da sua absorção e metabolismo, que são determinados pela estrutura química, como a conjugação com outros fenólicos, grau de glicosilação, acilação, tamanho molecular, solubilidade, hidroxilação e metilação (BALASUNDRAM et al., 2006).

a. Flavonois

É uma das subclasses de substâncias polifenólicas de maior interesse científico por suas importantes propriedades biológicas, sendo que em alguns casos podem ser encontradas na forma glicosilada. A estrutura dos flavonois consiste em uma ligação dupla em C2 e C3, um grupo hidroxila em C3 e um grupo cetona em C4 do anel C do núcleo flavan (HOWARD; HAGER, 2007) (Figura 10). Mais de 200 estruturas não glicosiladas já foram relatadas, e entre elas as mais comuns são: campferol, miricetina e quercetina, a sua principal diferença é o número e posição dos grupos OH em C3 e C5. Geralmente os açúcares ligados

na posição C3 são glicose e galactose, porém, arabinose, ramnose, rutinose e xilose também podem ser encontrados (SEERAM et al., 2006).

O fruto da amoreira-preta contém quantidades apreciáveis de flavonóis, encontrados exclusivamente na parte carnuda da drupa, e ocorrem principalmente na forma glicolisada (SIRIWOHARN et al., 2004; CHO et al., 2005). Foram relatados valores para flavonóis totais, calculados em equivalente rutina, que variaram de 12 a 30 mg 100 g⁻¹ (peso fresco) (CHO et al., 2004; CHO et al., 2005; SIRIWOHARN et al., 2004; SELLAPPAN et al., 2002; WANG; LIN, 2000; SIRIWOHARN et al., 2005).

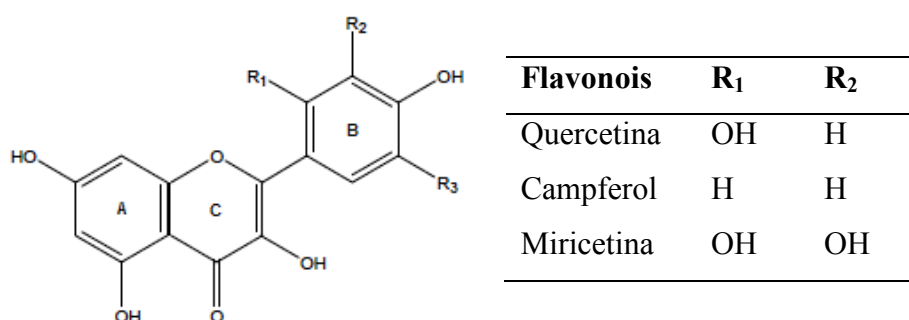


Figura 10. Estrutura química básica de um flavonol

Fonte: PELUSO, 2006. Adaptado por CELANT, V. M., 2013.

O perfil dos flavonóis é complexo em amora, devido à ocorrência de nove quercetinas e três derivados do campferol, bem como dois compostos derivados da quercetina adicionados (Tabela 4). Além disso, a quercetina 3-xilosilglucuronídeo é relatada em algumas variedades de amora. De acordo com Cho et al. (2005) a quercetina 3-galactosídeo e a quercetina 3-glicosídeo são os flavonóis principais de 5 genótipos de amora, embora algumas variedades apresentem níveis elevados da forma acilada da quercetina 3-[6-(3-hidroxi-3-metilglutaróil)]-β-galactosídeo.

A ocorrência de campferol e miricetina é observado apenas em alguns genótipos de amora, provavelmente devido a diferenças genéticas (CHO et al., 2004; SIRIWOHARN et al., 2004; HENNING, 1981). Bilyk; Sapers (1986) relataram que frutos maduros de amoreiras *Rubus* spp. contém 0,5-3,5 e 0,1-0,3 mg⁻¹ 100 g (peso fresco) de quercetina e campferol, respectivamente, enquanto Sellappan et al. (2002) relataram 9,9 mg 100 g⁻¹ de miricetina em amoras cultivadas na Geórgia – Estados Unidos. Relatos ainda indicam que frutos de amora cultivados em regiões tropicais montanhosas tendem a reduzir seus níveis de flavonoides totais conforme o amadurecimento do fruto, que

compreende os estádios da cor vermelha (30 mg 100 g peso fresco) para o roxo azulado escuro (14 mg 100 g⁻¹ peso fresco) (ACOSTA-MONTOYA et al., 2010).

Tabela 4. Antocianinas e flavonoides identificados em amora-preta

Antocianinas	Flavonoides
Cianidina 3-galactosídeo	Quercetina 3-galactosídeo
Cianidina 3-glicosídeo	Quercetina 3-glicosídeo
Cianidina 3-arabinosídeo	Quercetina 3-rutinosídeo
Cianidina 3-xilosídeo	Quercetina 3-xilosilglucuronídeo
Malvidina 3-arabinosídeo	Quercetina 3-glicosilpentosídeo
Pelargonidina 3-glicosídeo	Kaempferol 3-glicoronídeo
Cianidina 3-rutinosídeo	Kaempferol 3-glicosídeo
Cianidina 3-soforosídeo	Kaempferol 3-galactosídeo
Cinidina 3-glicosilrutinosídeo	Kaempferol 3-xilosilglicoronídeo
Cianidina 3-(3-malonil)glicosídeo	Quercetina 3-glicuronídeo
Cianidina 3-(6-molonil)glicosídeo	Quercetina 3- <i>O</i> -[6-(3-hidróxi-3-metil-glutaroil)- β -D-galactosídeo mirecitin
	Miricetina
	Quercetina 3-metóxi-hexosídeo
	Quercetina 3-oxalilpentosídeo

Fonte: HOWARD; HAGER, 2007; SELLAPPAN et al., 2002; HAGER et al., 2008.

A ocorrência de campferol e miricetina é observado apenas em alguns genótipos de amora, provavelmente devido a diferenças genéticas (CHO et al., 2004; SIRIWOHARN et al., 2004; HENNING, 1981). Bilyk; Sapers (1986) relataram que frutos maduros de amoreiras *Rubus* spp. contém 0,5-3,5 e 0,1-0,3 mg⁻¹ 100 g (peso fresco) de quercetina e campferol, respectivamente, enquanto Sellappan et al. (2002) relataram 9,9 mg 100 g⁻¹ de miricetina em amoras cultivadas na Geórgia – Estados Unidos. Relatos ainda indicam que frutos de amora cultivados em regiões tropicais montanhosas tendem a reduzir seus níveis de flavonoides totais conforme o amadurecimento do fruto, que compreende os estádios da cor vermelha (30 mg 100 g peso fresco) para o roxo azulado escuro (14 mg 100 g⁻¹ peso fresco) (ACOSTA-MONTOYA et al., 2010).

b. Flavona

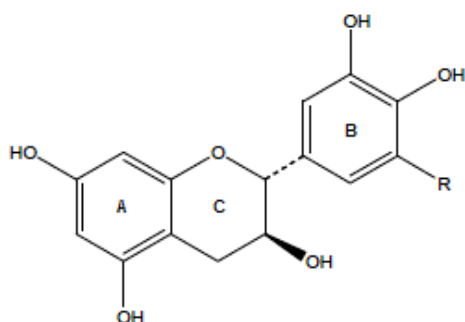
Classe pouco representativa em alimentos. Caracterizam-se pela ligação insaturada entre carbonos 2 e 3, pela presença de carbonila no carbono 4 e pela ausência de hidroxila

ligada ao carbono 3. Suas formas agliconas mais conhecidas são apigenina e luteolina (HOWARD; HAGER, 2007).

As flavonas e flavonóis estão muito presentes em flores e nas folhas de todas as plantas verdes, absorvem luz em comprimentos de ondas mais curtos do que as antocianidinas, agem na proteção das células contra o excesso de radiação UV-B (280-320 nm), pois se acumulam nas camadas epidérmicas as folhas e caules e absorvem intensamente a luz na região UV-B, enquanto permitem a passagem contínua dos comprimentos de luz visível. As isoflavonas são flavonoides principalmente encontrados em leguminosas, com atividades biológicas descritas, como potente inseticida (rotenóides) e antiestrogênica (TAIZ; ZEIGER, 2009).

c. Flavanois (flavan-3-óis)

São os flavonoides mais encontrados na natureza. A associação dimérica entre (-)epicatequinas e (+)catequinas dá origem às procianinas. As substâncias poliméricas formadas por estes monômeros são denominadas taninos condensados ou proantocianidinas. Diferente da maioria dos flavonoides, estes não se apresentam na forma glicosilada. São caracterizados pela ligação saturada entre os carbonos 2 e 3, pela ausência de carbonila no carbono 4 e pela hidroxila ligada ao carbono 3 (Figura 11). Destacam-se as catequinas e seus derivados epicatequina, galocatequina e epigalocatequina (PELUSO, 2006).



Flavanois	R
(+)-Catequina	H
(+)-Galocatequina	OH

Figura 11. Estrutura química básica de um flavanol

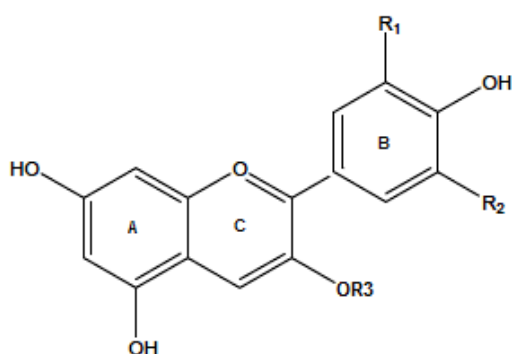
Fonte: PELUSO, 2006. Adaptado por CELANT, V. M., 2013.

d. Flavanona

É o grupo minoritário dos flavonoides. Sua presença é destacada em frutas cítricas, onde apresentam-se fundamentalmente na forma aglicona, enquanto nos demais vegetais destacam-se as formas glicosiladas. Caracterizam-se pela ligação saturada entre carbonos 2 e 3, pela presença de carbonila no carbono 4 e pela ausência de hidroxila ligada ao carbono 3. Entre as flavanonas glicosiladas, a hesperidina, a naringina (formas glicosiladas de hesoeretina, naringenina, respectivamente) e a narirutina são as mais comuns.

e. Antocianidinas

Pertencente à classe dos flavonoides, as antocianidinas são os compostos fenólicos responsáveis pelos pigmentos que variam da coloração do vermelho para o roxo ao preto em frutos e vegetais e são reconhecidas pelos seus potenciais benefícios à saúde (JENSEN et al., 2008; CHO et al., 2004). Antocianinas são as formas glicosiladas de antocianidinas. Devido à sua propriedade de pigmentação, são utilizadas na indústria de alimentos como aditivos para sucos e geleias. Caracterizam-se pela ligação saturada entre carbonos 2 e 3 e pelas insaturações entre o heteroátomo de oxigênio e o carbono 2 e entre os carbonos 3 e 4; pela ausência de carbonila no carbono 4, pela hidroxila ligada ao carbono 3 e principalmente pela protonização do heteroátomo de oxigênio (Figura 12). Pode-se citar como exemplos a cianidina e a desfnidina. Sem a presença dos açúcares em sua estrutura, as antocianinas são conhecidas como antocianidinas. A cor das antocianinas é influenciada pelo número de grupos hidroxila e metoxila no anel B da antocianidina, pela presença de ácidos aromáticos esterificados ao esqueleto principal e ao pH do vacúolo no qual tais compostos estão armazenados (KONDO et al., 1992).



Antocianidina	R ₁	R ₂	R ₃
Cianidina	OH	OH	H
Pelargonidina	H	OH	H
Malvidina	OCH ₃	OH	OCH ₃
Delfindina	H	H	

Figura 12. Estrutura básica de uma antocianidina

Fonte: PELUSO, 2006. Adaptado por CELANT, V. M., 2013.

As antocianinas identificadas nos frutos de amoreira-preta incluem cianidina 3-glicosídeo (Figura 13a), cianidina 3-rutinosídeo (Figura 13b), cianidina 3-galactosídeo, cianidina 3-xilosídeo, cianidina 3-dioxalil-glicosídeo, cianidina 3-soforosídeo, cianidina 3-glucosilrutinosídeo, cianidina 3-arabinosídeo, malvidina 3-arabinosídeo, pelargonidina 3-glicosídeo, cianidina 3(3-malonil)glicosídeo e cianidina 3-(6-malonil)glicosídeo (WU; PRIOR, 2005a; SHAHIDI; NACZK, 2004). Cianidina 3-dioxaloil-glicosídeo, uma antocianina zwitteriônica, é encontrada somente em amora-preta (Tabela 4) (STINTZING et al., 2002).

Estudos mostram que o teor de antocianinas em amoras varia devido a diferenças entre as variedades, condições ambientais, local de cultivo, grau de maturação e processamento (BEATTIE et al., 2005). Cho et al. (2004) relataram o teor de antocianinas de seis genótipos de amora, e estes variaram de 114,4 a 241,5 mg 100 g⁻¹ (peso fresco). Além disso, os derivados de cianidinas podem variar em amoras, devido a diferenças genéticas. Este conceito foi demonstrado por Fang-Chiang; Wrolstad (2005) em estudo com 51 amostras de amoras, cujos resultados foram 44-95% cianidina 3-glicosídeo, em torno de 53% cianidina 3-rutinosídeo, em torno de 11% cianidina 3-xilosídeo, em torno de 5% cianidina 3-(malonil)glicosídeo e em torno de 15% de cianidina 3-dioxaloilglicosídeo (HOWARD; HAGER, 2007; FAN-CHIANG; WROLSTAD, 2005).

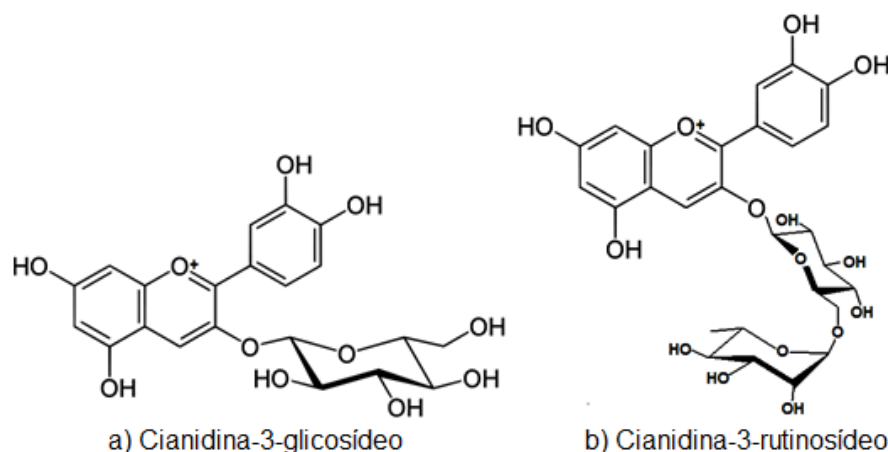


Figura 13. Estrutura química da cianidina-3-glicosídeo (a) e da cianidina-3 rutinosídeo (b)

Fonte: BEATTIE et al. (2005). Adaptado por CELANT, V. M., 2013.

As antocianinas exercem propriedades anti-inflamatórias, anti-virais, antiproliferante, e anticancerígenas (SKREDE; WROLSTAD, 2002). Nos Estados Unidos o consumo de antocianinas é mais elevado do que o de outros flavonoides, devido à sua ampla distribuição e

ocorrência em frutas e vegetais e estima-se estar entre 82 e 215 mg dia (McGHIE; WALTON, 2007).

f. Isoflavonoides

Grupo minoritário de flavonoides encontrados da família das leguminosas. Caracterizam-se pela ligação insaturada entre carbonos 2 e 3, pela presença de carbonila no carbono 4 e pela ligação do radical fenil (anel B) ao carbono 3. Daidzeína, genisteína e gliciteína são as principais formas agliconas encontradas em soja (HOWARD; HAGER, 2007).

3.3.3 Taninos

Taninos representam o grupo de compostos polifenólicos encontrados em muitos frutos e incluem constituintes oligoméricos e poliméricos. Os taninos são conhecidos por serem antinutricionais porque se ligam a grupos de peptídeos-NH, precipitando-os e impedindo a sua hidrólise no estômago (SHAHIDI; NACZK, 2004). Por exemplo, flavan-3-óis (catequinas) e flavan-3,4-dióis (leucoantocianinas) interagem com proteínas, amido e enzimas digestivas para formar complexos menos digestíveis, resultando em uma absorção reduzida destes nutrientes (SKREDE; WROLSTAD, 2002).

Os taninos são classificados em dois grupos com base em sua estrutura: taninos condensados, isto é, proantocianidinas, e taninos hidrolisáveis, que são os elagitaninos e galotaninos. As proantocianidinas são oligômeros polímeros de flavonoides e em particular flavan-3-óis, enquanto que os taninos hidrolisáveis são ácido gálico glicolizado (SHAHIDI; NACZK, 2004). Os frutos de amora contêm dois tipos principais de proantocianidinas: procianidinas e propelargonidinas, que são compostas exclusivamente de epicatequina e epiafzelequina, respectivamente (HOWARD; HAGER, 2007). Com base no padrão de hidroxilação dos anéis A- e B-, as proantocianidinas (peso molecular $\geq 2000-4000$ Da) são divididas em três grupos: procianidinas, prodelfinidinas e propelargonidinas. Há cerca de 500 procianidinas identificadas em plantas (SHAHIDI; NACZK, 2004). A procianidina encontrada em amora-preta tem sido predominantemente unidades de epicatequina ligadas através de C4→C8, chamada de

“ligação tipo B”, com um grau médio de polarização de 3,2. As amoras contêm monômeros (7,3 mg 100 g⁻¹ peso fresco), dímeros (3,6 mg 100 g⁻¹ peso fresco), trímeros (3,6 mg 100 g⁻¹ peso fresco) tetrâmeros à hexâmetros (7,3 mg 100 g⁻¹ peso fresco), heptâmeros à pentâmeros (4,2 mg 100 g⁻¹ peso fresco), e baixos níveis de polímeros (1,5 mg 100 g⁻¹ peso fresco), resultando em um conteúdo total de procianidina de 27,0 mg 100 g⁻¹ peso fresco (GU et al., 2004). Taninos hidrolisáveis, especificamente elagitaninos de vários pesos moleculares, são encontrados em amora em quantidades apreciáveis. Elagitaninos e derivados do ácido elágico podem ser identificados utilizando cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS), e os resultados são relatados como equivalentes em ácido elágico, devido à grande diversidade de elagitaninos em frutos e também a falta de padrões em elagitaninos (HOWARD; HAGER, 2007).

A estrutura dos elagitaninos em amoras são complexas, apresentando-se como um desafio quanto a sua caracterização (Tabela 4) (SKREDE; WROLSTAD, 2002). A estrutura básica dos elagitaninos consiste de um núcleo de glicose esterificada com ácido hexahidróxidifênico (HHPD) (Figura 14).

Quando hidrolisado por um ácido ou uma base, HHPD é alterado para a forma dilactona, ácido elágico (HOWARD; HAGER, 2007). Um elagitanino bis-HHPD glucopiranoose é também conhecido como pedunculagina, e a forma galoilbis-HHPD glucopiranoose (HAGER et al., 2008). Além disso, estes compostos podem ser encontrados como α - ou β -glucopiranosídeo com as unidades de HHDP *R* ou *S* configuradas relativamente para C4 e C1 da glicose (TANAKA et al., 1993; KHANBABAEI; REE, 2001). Os elagitaninos encontrados nos frutos e nas folhas de amora são, em sua maioria, formas polarizadas do galoil-bis-HHDP (HAGER et al., 2008).

As sementes da amora contêm maior quantidade de elagitaninos e ácido elágico quando comparada com outras partes do fruto. De fato, 88% destes são encontrados nas sementes, e 12% na polpa. Derivados do ácido elágico são encontrados entre 1,2-3,0 mg 100 g⁻¹ peso fresco, enquanto que os elagitaninos apresentam-se entre 51,1-68,3 mg 100 g⁻¹ peso fresco (SIRIWOHARN et al., 2005). As sementes das cultivares Marion e Evergreen apresentam valores mais elevados do que as demais cultivares, contendo até 3.230 e 2.120 mg 100 g⁻¹ peso fresco de elagitaninos e ácido elágico total, respectivamente (BUSHMAN et al., 2004).

Os dados sobre a ingestão de elagitaninos e ácido elágico são escassos. No entanto, como uma referência diária a respeito da ingestão de elagitaninos de frutos nas populações

finlandesa e alemã são de 12 e 5 mg / dia⁻¹, respectivamente (OVASKAINEN et al., 2008; RADTKE et al., 1998).

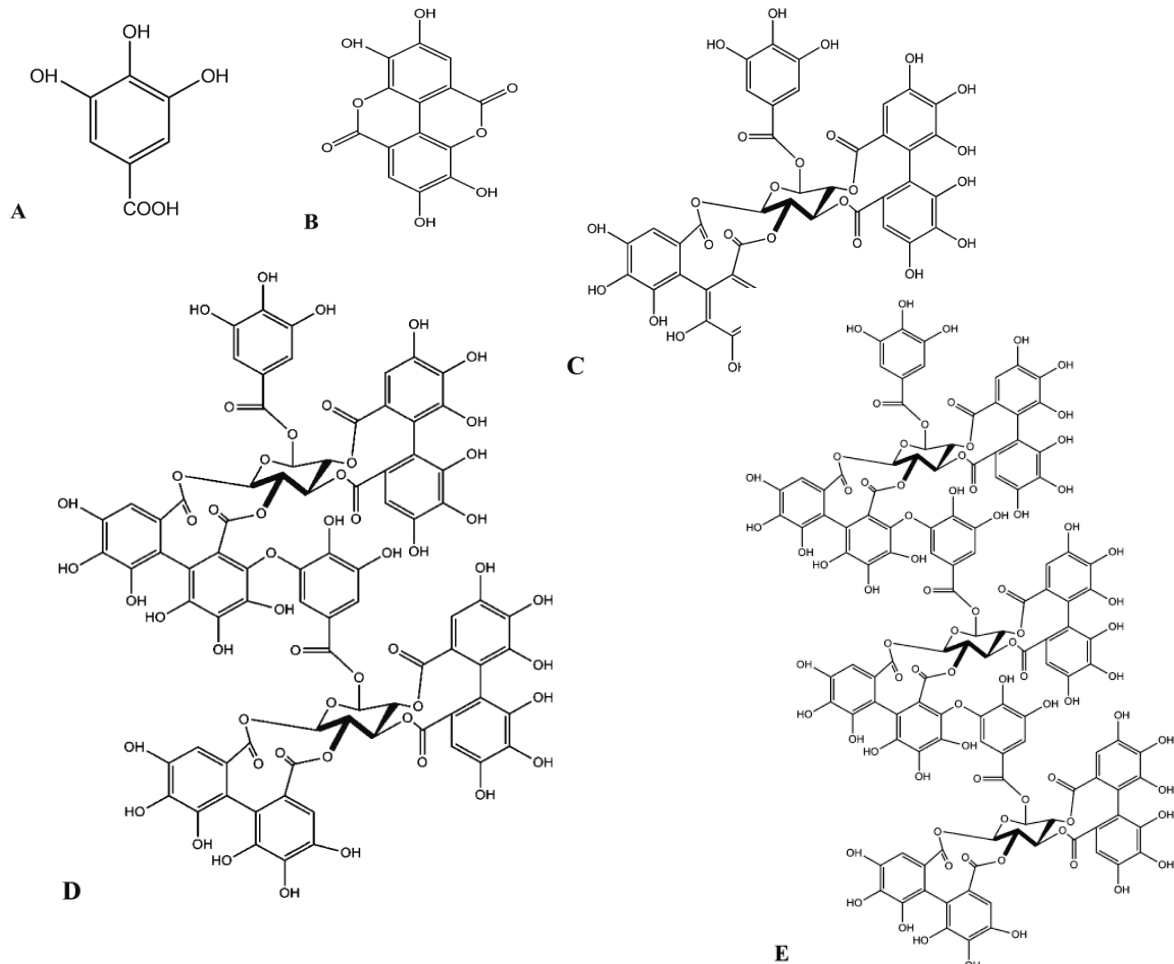


Figura 14. Estrutura do ácido gálico (A), ácido elágico (B), galoil-bis-HHDP glicose (C), sanguin H-6/lambertianina A (D) e lambertianina C (E)

Fonte: HAGER et al., 2008.

3.4 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico (AA) é um poderoso antioxidante pela facilidade de oxidação devido à presença do grupo fortemente redutor em sua estrutura, denominado de redutona, a qual se refere também as hidroxilas do grupo C=C, o AA faz parte de um grupo de substâncias químicas complexas necessárias para o funcionamento adequado do organismo. É uma vitamina hidrossolúvel e termolábil, o que significa que o organismo usa o que necessita

e elimina o excesso, sendo encontrado, principalmente, em frutas cítricas e hortaliças folhosas (BOBBIO; BOBBIO, 1992; ZHANG; HAMAUZU, 2004).

O AA desempenha várias funções biológicas relacionadas ao sistema imune, formação de colágeno, absorção de ferro, inibição de nitrosaminas e atividade antioxidante (VANNUCHI; JORDÃO JÚNIOR, 1998). O AA é um composto com seis carbonos, estruturalmente relacionado com a glicose e outras hexoses, sendo reversivelmente oxidado no organismo em ácido deidroascórbico e encontra-se na natureza sob a forma reduzida, denominada de ácido L-ascórbico, ou oxidada na forma de ácido L-dehidroascórbico (DHA), porém, a forma oxidada está menos difundida nas substâncias naturais e representa o produto primário do processo de oxidação do anel lactona do ácido L-ascórbico (Figura 12). A transformação do AA em DHA ocorre normalmente no interior do organismo, e como é reversível, permite que uma destas formas possa ser transformada na outra. Essa capacidade de conversão atua como um sistema oxido-redutor, que é capaz de transportar hidrogênio no processo de respiração em nível celular (WELCH, 1995; TAVARES et al., 2000).

O ácido ascórbico é um composto com seis carbonos, estruturalmente relacionado com a glicose e outras hexoses, sendo reversivelmente oxidado no organismo em ácido deidroascórbico. Encontra-se em equilíbrio entre a forma reduzida e oxidada, ácido L-ascórbico e ácido L-dehidroascórbico, respectivamente (Figura 12). A carência dessa vitamina Segundo Kader; Seung (2000), a vitamina C (AA) é mais importante na nutrição humana e está presente em frutas e hortaliças, responsáveis por suprir cerca de 90% das suas necessidades de AA.

O ácido L-dehidroascórbico (DHA) também apresenta atividade vitamínica, pois é facilmente reduzido no organismo, e apresenta cerca de 80% da atividade do AA. O processo de oxidação é reversível, que devido à perda de dois elétrons, leva ao ácido L-dehidroascórbico (Figura 15). A atividade antioxidante do AA envolve a doação de um elétron e a formação do radical livre ascorbato (ROSA et al., 2007).

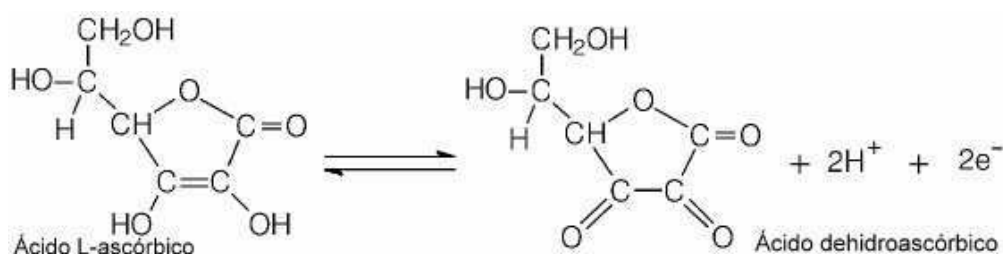


Figura 15. Estrutura da molécula do ácido L-ascórbico e do ácido dehidroascórbico

Fonte: SILVA et al., 2006.

O teor de vitaminas nas frutas pode variar dependendo da espécie, do estágio de maturação na época da colheita, de variações genéticas, do manuseio pós-colheita, das condições de estocagem e do tipo de processamento (SILVA et al., 2006).

3.5 Propriedades Bioativas e Fitoterápicas

Os organismos vivos possuem sistema de redução-oxidação necessário para manter o equilíbrio entre os radicais livres gerados e o sistema antioxidante (GIUSTI; JING, 2007). A formação de grandes quantidades de radicais livres podem levar ao estresse oxidativo, levando a várias doenças degenerativas e ao envelhecimento (GIUSTI; JING, 2007; O'BYRNE et al., 2002; AMES et al., 1993). Apesar de alguns pesquisadores argumentarem que, em muitos casos, o estresse oxidativo não é a causa primária de doenças e que a formação de radicais é secundária à lesão do tecido por doença, há evidências que ligam o estresse oxidativo com várias doenças crônicas (SKREDE; WROLSTAD, 2002; MODY, et al., 2001; FINKEL, 2003).

Wada; Ou (2002) classificaram a atividade antioxidante de amoras a terceira maior, depois do morango e da framboesa preta com base na sua ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) (WADA; OU, 2002). Isto pode ser atribuído à grande quantidade de antocianinas aciladas e cianidinas-3-glicosídeo presentes em amoras. De fato, a cianidina-3-glicosídeo tem alta atividade ORAC, cerca de 3,5 vezes mais forte que o Trolox (análogo da vitamina E), enquanto que a pelargonidina, também encontrada em amoras, tem atividade antioxidante semelhante ao Trolox (WANG et al., 1997).

As antocianinas aciladas estão altamente correlacionadas com a capacidade antioxidante em frutas (CHO et al., 2004). Cho et al. (2004) observaram em extratos de amora, uma forte relação linear entre os valores de ORAC e teores de antocianinas aciladas ($r_{xy} = 0,91$), e esta correlação foi mais fraca para antocianinas totais monoglicosídeos ($r_{xy} = 0,69$). Essa relação concorda com estudos de biodisponibilidade que demonstram diferenças estruturais em antocianinas tais como porções de açúcar, e grupos acilados afetam a biodisponibilidade, estabilidade, e outros efeitos biológicos das antocianinas (WU et al., 2006). As atividades biológicas dos componentes do fruto também variam com as espécies e também dentro das cultivares (GIUSTI; JING, 2007).

As antocianinas trabalham pela eliminação dos radicais livres em nosso organismo, com o 3,4-dihidróxi substituindo o anel B. Eles reagem rapidamente com os radicais, tais

como hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), azida ($\text{N}_3\bullet$) e peroxilo ($\text{ROO}\bullet$) para formar radicais de flavonoides estáveis, reduzindo desta forma o estresse oxidativo (GIUSTI; JING, 2007; SKREDE; WROLSTAD, 2002; RICE-EVANS et al., 1996). Os flavonoides, no entanto, são mais lentos para reagir com os radicais lipídeo peroxil ($\text{LOO}\bullet$) e superóxido (O_2^-) devido à reduzida disponibilidade de flavonoides polares para a reação com os radicais $\text{LOO}\bullet$ (RICE-EVANS et al., 1996). As antocianinas também funcionam como antioxidantes por seus íons metálicos quelantes que moderam os níveis de pH com seus grupos hidroxilas ionizados do anel B (GIUSTI; JING, 2007).

3.5.1 Doenças Cardiovasculares

Os elevados níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL's) no plasma são fatores de risco para as doenças cardíacas (ESTERBAUER et al., 1996). Os compostos fenólicos presentes nos frutos, mostraram-se efetivos protetores contra as doenças cardíacas, pela inibição *in vitro* e *in vivo* da oxidação de LDL através da eliminação dos radicais livres devido a doação de moléculas de hidrogênio (SHAHIDI; NACZK, 2004). Os compostos fenólicos também protegem o LDL a partir da indução do peróxido de hidrogênio ao estresse oxidativo de células endoteliais humanas *in vitro* (GIUSTI; JING, 2007).

Os compostos fenólicos presentes nos frutos de amora demonstraram fortes propriedades inibidoras *in vitro* em ensaios de oxidação de LDL humano e de lipossomas de lecitina. Os elevados teores de glicosídeos de cianidina em amoras são responsáveis pela alta atividade antioxidante e também pela proteção contra a oxidação do LDL, já os ácidos hidrocínâmicos são os mais importantes no sistema de oxidação de lipossomas. As antocianinas, flavan-3-óis e ácidos hidrocínâmicos têm apresentado efeitos inibitórios na oxidação dos lipossomas (HEINONEN et al., 1998). Além disso, as antocianinas exerceram efeitos protetores *in vitro* em células endoteliais humanas primárias, por suprimir a secreção da proteína 1 (MCP-1) quimiotática de citocina induzida por quimiocina do monócito (GARCIA-ALONSO et al., 2009). MCP-1 é uma proteína envolvida diretamente na aterogênese através da sua função de recrutar macrófagos para locais de infecção ou inflamação (GARCIA-ALONSO et al., 2009; DE PASCUAL-TERESA et al., 2010).

Embora não tenha sido demonstrado diretamente pelos flavonoides presentes em amoras, alguns flavonoides tem mostrado função protetora de plaquetas, o que é crítico na patogênese de doenças cardíacas. Estudos *in vitro* demonstraram que os flavonoides reduzem

a agregação de plaquetas, diminuindo a produção de plaquetas de ânions superóxido e aumentando a produção de óxido nítrico pelas plaquetas (FREEDMAN et al., 2001).

3.5.2 Câncer

Estudos epidemiológicos e clínicos sugerem que 20% ou mais dos casos de câncer são evitáveis com uma dieta composta de 400-800 g de diversas frutas e vegetais por dia (GIUSTI; JING, 2007). O câncer é um processo de múltiplos estágios complexos, que começa com o início de uma célula cancerosa causada por danos no DNA, levando a acumulação de mutações, a promoção da proliferação de tumor e a expansão do tumor, e, finalmente, a progressão para a malignidade e metástase (DUTHIE, 2007). O papel dos compostos fenólicos na redução do risco do câncer tem sido mostrado *in vitro*, em animais e em estudos clínicos (GIUSTI; JING, 2007). Os fitoquímicos podem modular a iniciação, a promoção e a progressão do câncer (DUTHIE, 2007). Os possíveis mecanismos anticarcinogênicos incluem atividade antioxidante, atividade de desintoxicação, indução de apoptose, antiproliferação e atividade antiangiogênica.

Tem sido relatado que as antocianinas induzem enzimas na fase II, que podem inativar agentes cancerígenos ativados por enzimas na fase I, desta forma inibindo possíveis danos ao DNA por carcinógenos (GIUSTI; JING, 2007). Tate et al. (2006) descobriram que extratos de amora de oito cultivares (Arapaho, Choctaw, Hull, Chicksaw, Triple Crown, Kiowa, Navajo e Chester) suprimiram a mutagênese em vários níveis. Mutagênese é um processo caracterizado por uma proliferação celular descontrolada e resistência à morte celular programada (DUTHIE, 2007). Além disso, os extratos também inibiram a mutagênese induzida por UV em *Salmonella typhimurium* TA100 em 90% com base no teste de Ames. O teste de Ames é um bom indicador *in vitro* do potencial mutagênico *in vivo*, com uma correlação de 90% entre uma resposta positiva em ensaios de carcinogenicidade em animais (TATE et al., 2006).

Serraino et al. (2003) relataram que extratos de amora desempenham papel protetor contra a indução de peroxinitrito que causa ruptura das hélices da cadeia de DNA em cultura de células endoteliais vasculares humanas. O extrato de amora contém 80% de cianidina-3-glicosídeo, e foi pesquisada a atividade antioxidante do extrato de amora na disfunção endotelial em células e em anéis vasculares expostos a peroxinitrito. Os extratos de amora em várias diluições reduziram a indução de peroxinitrito suprimindo a respiração

mitocondrial e os danos ao DNA em células endoteliais da veia umbilical humana (SERRAINO et al., 2003).

Outros estudos *in vitro* mostraram que o extrato de amora inibe a proliferação de células cancerosas do pulmão humano. As antocianinas presentes em amora também podem suprimir o crescimento de células cancerígenas, modificando as vias de sinalização celular, tais como a modulação da expressão da proteína ativada 1 (AP-1) e do fator nuclear de transcrição κB (NF κB), proteínas importantes que regulam a proliferação e o controle do ciclo celular. O extrato de amora também demonstrou propriedades inibidoras na indução do câncer AP-1 e NF κB , e suprimiu a expressão de duas proteínas envolvidas na iniciação e progressão tumoral (DUTHIE, 2007).

3.5.3 Outras doenças

Em estudos desenvolvidos por Tsuda et al. (2003), a cianidina-3-glicosídeo (antocianina predominante em amora) foi obtida a partir de molho roxo e tem sido demonstrada a prevenção da obesidade em ratos alimentados com uma dieta elevada em teor de gorduras em comparação com ratos alimentados com uma dieta de elevado teor de gorduras porém, sem antocianinas. Da mesma forma, antocianinas purificadas de mirtilos foram utilizadas para melhorar o peso e composição corporal e também para reduzir a obesidade em ratos (PRIOR et al., 2008).

Amoras também têm mostrado efeito positivo sobre mudanças relacionadas à idade, e podem ser benéficas na prevenção de doenças associadas ao envelhecimento neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer. Shukitt-Hale et al. (2009) demonstraram que 2% de amora implementada na dieta por 19 meses em ratos foi eficaz para melhorar o desempenho motor em três tarefas de equilíbrio, coordenação e desempenho cognitivo. A cianidina-3-glicosídeo foi encontrada no cérebro de ratos machos alimentados durante 15 dias com uma dieta contendo 1,5% de amora, enfatizando o potencial das antocianinas na neuroproteção (TALAVERA et al., 2005).

Embora as atividades antimicrobianas de taninos não estejam documentadas, taninos hidrolisáveis de framboesas vermelhas mostraram atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus* e *Salmonella*, em estudos com animais. As amoras são fontes de elagitaninos, e são necessários mais estudos sobre suas propriedades antimicrobianas (GIUSTI; JING, 2007). Não há estudos relacionados à utilização de amoras, em

particular, no combate à diabetes. No entanto, há evidências de que as antocianinas podem conferir efeitos protetores no sistema vascular em pacientes diabéticos. A administração de antocianinas de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), na dose de 600 mg / dia durante 6 meses demonstraram uma redução significativa na biossíntese de colágeno polimérico e da glicoproteína estrutural que resultam em espessura capilar em pessoas com diabetes (BONIFACE et al., 1985).

Estudo realizado por Kaume et al. (2010) demonstrou que a suplementação de amoras no nível de 5% em ratos ovariectomizados apresentaram aumento na densidade mineral óssea da tíbia de 2,4%, no fêmur, 4,3% e na quarta vértebra lombar, 2,7%, em comparação a outros ratos que não receberam o suplemento.

Estudos sobre as amoras revelam que a sua composição e concentração fenólica são influenciadas por vários fatores, incluindo a variedade, local de cultivo e a maturação. Em termos de benefícios para a saúde, estes compostos fenólicos têm mostrado efeitos protetores relacionados com a idade em doenças neurodegenerativas e também inibição da oxidação LDL e de lipossomas *in vitro*. O extrato de amora também exerceu efeitos antimutagênicos por vias de sinalização celulares modificadas e também supressão dos fatores de promoção de tumores *in vivo* e *in vitro*. No entanto, as propriedades anti-obesidade, antidiabéticas, antimicrobianas, anti-inflamatórias necessitam de maiores estudos. São necessárias mais pesquisas para exploração do metabolismo e biodisponibilidade e também dos mecanismos pelos quais eles conferem benefícios à saúde (KAUME et al., 2012).

3.6 Métodos de Avaliação da Atividade Antioxidante

É de grande interesse para o público em geral, especialistas da área médica e nutricional e pesquisadores da área da saúde, ciência, tecnologia e engenharia dos alimentos, conhecer os constituintes e a ação antioxidante dos alimentos que são consumidos. Devido à complexidade da composição desses alimentos, a separação e o estudo individual de cada substância antioxidante são praticamente inviáveis além de custosos. Por isso, espera-se dos pesquisadores que venham a ter métodos rápidos para a determinação da eficiência dos antioxidantes na prevenção de doenças. Entretanto, muitos métodos ainda precisam ser aperfeiçoados. Um teste de atividade antioxidante com base em reações químicas parece não ser condizente com situações reais, ainda que existam muitas publicações com medida de atividade antioxidante *in vitro* (HUANG et al., 2005).

A atividade antioxidante não pode ser diretamente medida, mas sim por meio de efeitos que os antioxidantes proporcionam no controle da extensão da oxidação. Os métodos utilizados para a medida dessa atividade são bastante diversificados. Alguns procedimentos baseiam-se numa determinada etapa da oxidação seguida pela medida do resultado, como por exemplo, a oxidação do ácido linoleico seguida da determinação de dienos conjugados. Em outros casos, não há uma clara distinção entre as várias etapas no procedimento (BECKER et al., 2004).

A determinação da atividade antioxidante em alimentos torna-se cada vez mais importante nas áreas de tecnologia e de nutrição. Embora exista uma grande diversidade de métodos, estes não são validados ou padronizados (MARTÍNEZ-VALVERDE et al., 2000).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Segundo Leong; Shui (2002), os modelos ABTS e DPPH são práticos e recomendados para a avaliação da capacidade antioxidante total de frutas. Entre os métodos químicos aplicados para determinar a capacidade antioxidante de um composto em capturar radicais livres, o método DPPH é um dos mais utilizados por ser considerado prático, rápido e estável (ESPIN et al., 2000). Ozgen et al. (2006), no estudo de métodos apropriados para se determinar a capacidade antioxidante total em frutas, concluem que o ABTS apresenta-se como um método estável e adequado quando associado aos métodos FRAP ou DPPH. O DPPH apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos e, portanto, os três testes mencionados representam uma boa seleção de métodos de medidas de atividade antioxidante em frutas e sucos de frutas.

Grandes esforços estão sendo despendidos em testes de compostos naturais antioxidantes com a ênfase em se melhorar os testes já existentes. Vários testes e modelos de sistemas não correspondem à realidade, ou seja, o verdadeiro efeito protetor dos antioxidantes e os dados obtidos podem ser confundidos por muitos fatores, incluindo a composição do sistema do teste, o substrato alvo da proteção e o modo da indução da oxidação. Como já descrito, há uma grande necessidade de padronização dos testes para minimizar as divergências nas metodologias utilizadas para avaliar os antioxidantes. Métodos que são mais específicos podem ser utilizados para obtenção de informações químicas que podem estar diretamente relacionadas com a deterioração de alimentos e de sistemas biológicos (FRANKEL; MEYER, 2000).

3.6.1 Atividade sequestrante do radical livre DPPH (DPPH[•])

O DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta e possui absorção máxima na faixa de 515-520 nm. A redução do radical DPPH[•] é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação (BRAND-WILLIANS et al., 1995).

O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes. O método de sequestro do radical livre DPPH[•] pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em curto período de tempo. Segundo Leong; Shui (2002), esse método tem sido uma ferramenta útil para se avaliar a capacidade antioxidante de frutas.

Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados, ou seja, quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre a mudança de cor (Figura 16) (MOLYNEUX, 2004).

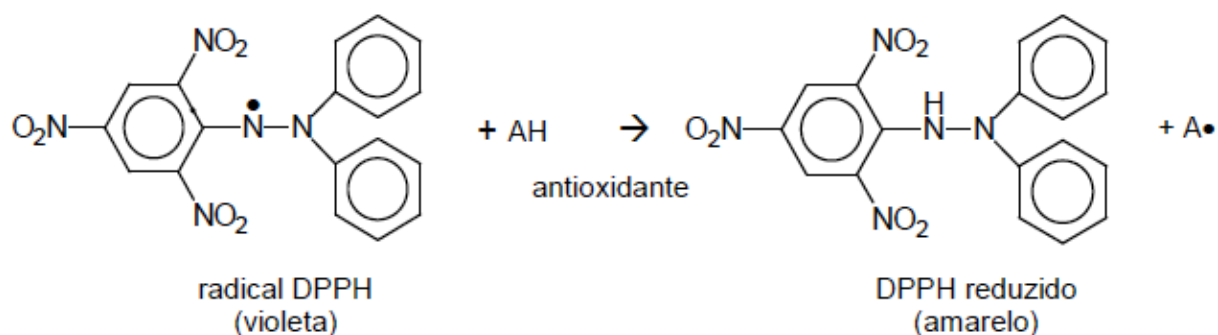


Figura 16. Estrutura química do DPPH[•] e reação com um antioxidante

Fonte: MOLYNEUX, 2004.

O método de DPPH[•] é considerado um método fácil e rápido para se avaliar a atividade antirradical de antioxidantes. Assim, pela facilidade e rapidez é muito utilizado em diversos estudos, o que resulta na diversidade de protocolos seguidos e divergências de resultados interlaboratoriais (SHARMA; BHAT, 2009).

Uma vantagem deste método é que o radical livre é estável e está disponível comercialmente, o que evita sua geração por distintas formas (como ocorre com o método ABTS), além de facilitar seu uso (LIMA et al., 2008).

As concentrações iniciais de DPPH[•] utilizadas têm sido muito variáveis: 0,025 g L⁻¹ a 0,415 g L⁻¹. Também tem variado o tempo de reação: tempo fixo de 30 minutos ou o tempo que leva para alcançar o estado de equilíbrio. Porém, observam-se, entretanto, características comuns: o emprego de solventes (metanol, etanol) e o monitoramento da cinética da reação. A maior homogeneidade no emprego do método facilita a comparação dos resultados obtidos em distintas classes de alimentos. Não pode, contudo, ser usado para amostras biológicas, pois as proteínas precipitam-se em meio alcoólico (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Por outro lado, o método DPPH[•] tem sido muito empregado na análise de mecanismos de reação dos compostos polifenólicos com radicais livres (SAWAI et al., 2005). Alguns compostos reagem rapidamente com o DPPH[•], reduzindo um número de moléculas igual ao número de grupos OH disponíveis, formando as correspondentes o-quinonas (BONDET et al., 1997).

3.6.2 Atividade antioxidante pelo método do ABTS^{•+}

Além do método do DPPH[•], outro método que é muito utilizado para a determinação da atividade antioxidante é o método do ABTS^{•+} (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico). Ambos apresentam excelente estabilidade em certas condições de análise, mas também mostram diferenças importantes frente aos antioxidantes e quanto à manipulação. O DPPH[•] é um radical livre que é adquirido dessa forma, sem a necessidade de preparo; já o radical ABTS^{•+} deve ser gerado por reações enzimáticas ou químicas. Outra diferença é que o ABTS^{•+} pode ser solubilizado em meios orgânicos e aquosos nos quais a atividade antioxidante pode ser determinada, dependendo da natureza dos compostos antioxidantes, enquanto que o DPPH[•] somente pode ser solubilizado em meios orgânicos (meios alcoólicos, especificamente) (ARNAO, 2000).

O método ABTS^{•+} é um dos testes de atividade antioxidante mais rápido e que oferece resultados reprodutíveis, além de outras vantagens como: oferecer vários máximos de absorção e uma boa solubilidade, permitindo análises de compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

Originalmente proposto por Miller et al. (1993), o procedimento baseava-se na ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio na presença do ABTS^{•+} para gerar o ABTS^{•+}, com ou sem antioxidantes no meio. Mas, devido a algumas críticas, o método foi aperfeiçoado sendo que o radical agora é gerado sem a presença de antioxidantes.

O método, segundo Re et al. (1999), baseia-se na geração do $\text{ABTS}^{+\bullet}$, de cor azul esverdeado, por meio da reação do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ com persulfato de potássio que possui absorção máxima em 645, 734 e 815 nm. Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio racional (Figura 17). Com a extensão da perda de cor, a porcentagem de inibição do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ é determinada em função do Trolox, um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais.

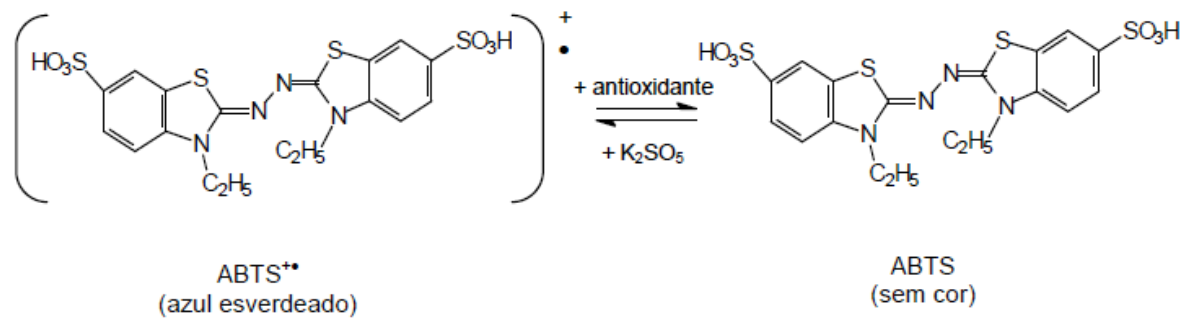


Figura 17. Redução do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio

Fonte: MOON; SHIBAMOTO (2009).

3.7 Qualidade Pós-colheita

3.7.1 Perda de massa

Thompson (1998) afirmou que a perda de massa dos frutos, através de processos metabólicos e físicos, pode ser incrementada pelo manejo inadequado ou exposição a organismo que causam enfermidades. A perda de massa pode ocasionar nos frutos perdas tanto em termos quantitativos como qualitativos, que durante o armazenamento é atribuída principalmente à redução de umidade no produto (KADER, 1992).

De acordo com Chitarra; Chitarra (2005) há redução no teor de água durante o armazenamento dos frutos, devido à diferença de pressão de vapor de água entre o fruto e o ambiente. A perda de massa máxima, para a maioria dos produtos hortícolas frescos, sem o aparecimento de murcha ou enrugamento da superfície, oscila entre 5 e 10%, sendo que a

perda máxima aceitável varia em função da espécie e do nível de exigência dos consumidores (FINGER; VIEIRA, 1997).

3.7.2 Acidez titulável

Segundo Bleironth (1981), com o amadurecimento, a acidez diminui até atingir um conteúdo tal, que juntamente com açúcar, dá à fruta o seu sabor característico, que varia com a espécie. O sabor e o aroma dos frutos dependem de complexas interações entre açúcares e ácidos orgânicos além de participação de fenóis e outros componentes voláteis (SEYMOUR et al., 1983). A concentração de ácidos diminui durante o amadurecimento da maioria das frutas, por ser usado como substrato da respiração ou como estrutura de outras substâncias sintetizadas (SALAYA, 2001).

De acordo com Chitarra; Chitarra (2005), após a colheita e durante o armazenamento, a concentração dos ácidos orgânicos usualmente declina em decorrência de sua utilização como substrato na respiração ou na sua transformação em açúcares, porém em alguns casos, há um pequeno aumento nos valores com o avanço da maturação. As transformações têm um fator importante nas características de sabor (acidez) e do aroma, uma vez que alguns compostos são voláteis. A acidez pode ser utilizada, em conjunto com a doçura, como ponto de referência do grau de maturação (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

3.7.3 Sólidos solúveis

Expressos em °Brix, o teor de sólidos solúveis têm sido utilizado como índice de maturidade para alguns frutos (MOURA, 1998). O teor de sólidos solúveis é utilizado como medida indireta do conteúdo de açúcares, pois seu valor aumenta à medida que estes vão se acumulando no fruto. Sua determinação não representa o teor exato de açúcares, pois também outras substâncias se encontram dissolvidas no conteúdo celular (vitaminas, fenólicos, pectinas, ácidos orgânicos), no entanto os açúcares são os mais representativos (CHITARRA, 2001). Segundo Chitarra; Chitarra (2005), os sólidos solúveis indicam a quantidade, em gramas, dos sólidos que se encontram dissolvidos no suco ou polpa e têm tendência de aumento com a maturação.

3.8 Peroxidase (POD) e Fenilalanina Amônia-liase (FAL)

As reações enzimáticas são muito importantes em alimentos, delas depende não só a formação de compostos altamente desejáveis como podem ter consequências indesejáveis. As reações enzimáticas ocorrem não só no alimento natural, mas também durante o seu processamento e armazenamento (BOBBIO; BOBBIO, 1989). Muitas enzimas são responsáveis por alterações na aparência, no sabor e aroma dos frutos naturais e processados (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002).

O escurecimento em frutos é iniciado pela oxidação enzimática de compostos fenólicos catalizada por enzimas como peroxidases e polifenoloxidasas (Figura 18). A ação dessas enzimas em várias frutas e vegetais *in natura*, processados e congelados, acarreta perdas econômicas consideráveis, diminuição da qualidade nutritiva, alterações do sabor desses alimentos, além de resultar, na maioria dos casos, em produtos com aparência ruim, os quais são rejeitados pelos consumidores (ARAÚJO, 2004; MAZZAFERA et al., 2002; LIMA et al., 2001).

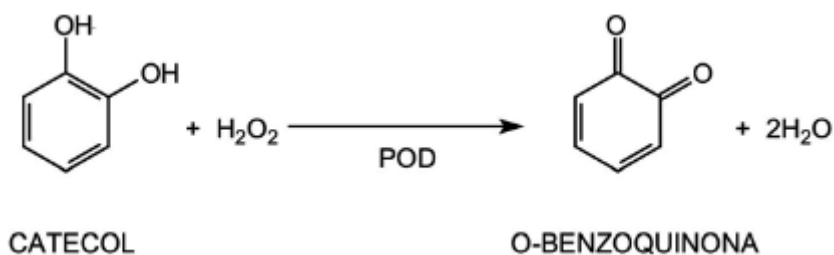


Figura 18. Ação da peroxidase (POD) sobre compostos fenólicos

Fonte: CHITARRA (2002).

As POD são um grupo de enzimas que contém ferro em seu grupo prostético e catalisam a oxidação de compostos fenólicos à quinonas, em presença de peróxido de hidrogênio (DUNFORD; STILLMAN, 1976). Essas enzimas são capazes de catalisar grande número de reações, como a produção ou catálise de H₂O₂ (ASADA, 1992; CHOI et al., 2007), formação de lignina e suberina (QUIROGA et al., 2000; CANTOS et al., 2002; LÓPEZ-SERRANO; RÓS-BARCELO, 1995), catabolismo de auxinas (LAGRIMINI et al., 1997), cicatrização de ferimentos (MUNZ et al., 1997) e oxidação de compostos fenólicos (TAKAHAMA; ONIKI, 1992), além de estarem envolvidas nos processos de senescência (VELJOVIC-JOVANOVIC et al., 2006), germinação de sementes (SCHOPPER et al., 2001) e florescimento (LOKHANDE et al., 2003).

A POD é uma enzima capaz de oxidar diferentes compostos, na presença de peróxidos, gerando radicais livres. Na ausência de peróxidos, essas enzimas podem, ainda, catalisar a oxidação de alguns substratos com auxílio do oxigênio molecular e, também, hidroxilar diferentes compostos aromáticos (tirosina, fenilalanina e outros fenólicos) (KOBLITZ, 2008).

Uma característica desta enzima, é que preferencialmente, para ela apresentar atividade, não é suficiente somente a presença do substrato, senão, também do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Justamente esta característica faz esta enzima ser vital para a planta, já que a enzima POD elimina, durante as suas reações, os peróxidos de hidrogênios que são produzidos pelo metabolismo normal da planta e por alguns estresses aos quais a planta é exposta. Sem a remoção destes compostos de hidrogênio, as células das plantas senesceriam rapidamente, considerando que estes peróxidos são altamente reativos, reagindo com as membranas celulares e alterando a seletividade das mesmas (KOBLITZ, 2008).

As POD apresentam numerosas funções fisiológicas e, na forma de múltiplas isoenzimas aniônicas ou catiônicas, atuam sobre diferentes substratos em reações, tais como: oxidação de fenólicos e carotenóides, degradação de auxinas, de clorofila e de ácido ascórbico, bem como na biossíntese de lignina. Portanto, a sua atividade relaciona-se com modificações nos atributos sensoriais (escurecimento, endurecimento, sabores estranhos) e no valor nutritivo (perda de atividade vitamínica do ácido ascórbico) dos produtos hortícolas (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

A FAL, enzima chave da via dos fenilpropanóides, catalisa a reação de desaminação do aminoácido L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico e amônia (Figura 19) (RITTER; SCHULZ, 2004; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008), além de ser o ponto de ramificação entre o metabolismo primário (via do ácido chiquímico) e secundário (HERRMANN; WEAVER, 1999).

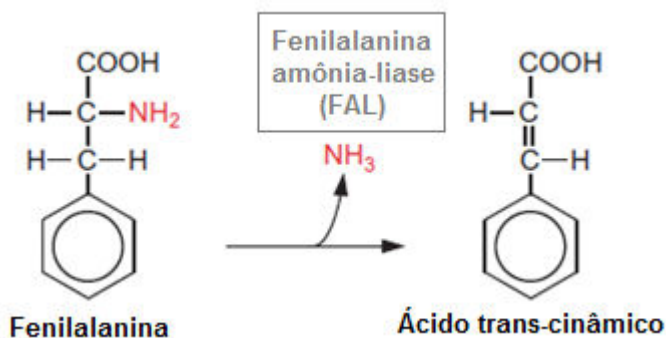


Figura 19. Desaminação do aminoácido L-fenilalanina pela fenilalanina amônia-liase

Fonte: HELDT, 2005. Adaptado por CELANT, V. M., 2013.

O ácido *trans*-cinâmico origina vários fenilpropanóides simples, como os ácidos *p*-cumárico, caféico, felúrico, sinápico, que estão presentes em altas concentrações no interior de células vegetais na forma de conjugados com açúcares, ou associados a carboidratos presentes na parede celular ou ácidos orgânicos. Esses compostos simples dão origem a lignina, suberina, cumarinas, flavonoides, antocianinas e fitoalexinas. Além disso, o ácido *trans*-cinâmico pode originar os ácidos benzoico e salicílico que não pertencem à classe dos fenilpropanóides (DIXON; PAIVA, 1995).

A FAL é uma enzima tetramérica composta por quatro subunidades diferentes (RITTER; SCHULZ, 2004), localizada, nas plantas, no citoplasma das células ou associada a estruturas membranosas (DIXON; PAIVA, 1995). A atividade da FAL pode ser alterada por ferimento (LÓPEZ-GÁLVEZ et al., 1996) radiação UV (EL GHAOUTH et al., 2003), O₃ (PAOLACCI et al., 2001), metal pesado (DAI et al., 2006), baixa concentração de nitrogênio, fosfato e ferro (DIXON; PAIVA, 1995), bem como devido a ataque de patógenos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condução, Local e Amostras Experimentais

Os frutos de amoreira-preta (*Rubus* spp.) utilizadas em cada experimento foram colhidos na primavera de 2010 em pomar no município de Marechal Cândido Rondon, oeste do Paraná, Brasil, localizado a 472 m de altitude, 24°35'54'' latitude Sul e 53°59'54'' longitude oeste (Figura 20a). As plantas estavam distribuídas no campo em espaçamento de 3,0 m x 0,5 m, foram plantadas em novembro de 2008 e conduzidas sob espaldeira simples de um fio em “T” (fios duplos paralelos), espaçados a 60 cm de distância e a 80 cm de altura do solo (Figura 20b). De acordo com a divisão climática, a região possui clima subtropical úmido, com temperaturas médias anuais entre 16,6 e 28,5 °C e solo predominante classificado como latossolo vermelho eutroférico.



Figura 20. Pomar localizado no Município de Marechal Cândido Rondon (a) e sistema de condução das amoreiras-pretas sob espaldeira simples de um fio em “T” (b)

Fonte: CELANT, V. M., Unioeste, Campus Marechal Cândido Rondon. 2013.

Para os experimentos, frutos foram cuidadosamente colhidos manualmente de forma aleatória entre as plantas, de acordo com o estágio de maturação descrito para cada experimento, nos períodos mais frescos do dia, (pela manhã entre 8:00 e 9:00 horas e a tarde entre 18:00 e 19:00 horas) e selecionados aqueles sadios e sem defeitos ou danos físicos. Imediatamente depois de colhidos, os frutos foram acondicionados em embalagens plásticas (± 200 g cada) e rapidamente transportados para o laboratório de Tecnologia de alimentos do CCA/Unioeste e refrigerados.

4.2 Planejamento Experimental

Como já citado anteriormente, as cultivares ‘Brazos’, ‘Tupy’, ‘Arapaho’, ‘Choctaw’ e ‘Guarani’ foram utilizadas neste experimento devido à sua grande produtividade na região Oeste do Paraná, especificamente no Município de Marechal Cândido Rondon / PR. Dentre as cinco cultivares escolhidas, a ‘Tupy’ é a que se destaca, com maior produtividade.

4.2.1 Composição fenólica e atividade antioxidante de frutos de amoreira-preta extraídos em água e etanol

Foram utilizados frutos maduros de cinco cultivares de amoreira-preta (*Rubus* spp.), denominadas ‘Brazos’, ‘Tupy’, ‘Arapaho’, ‘Choctaw’ e ‘Guarani’ (Figura 21). Nesta investigação foram avaliados os conteúdos de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas totais e a capacidade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico dos frutos. Análises quanto ao pH, sólidos solúveis, acidez titulável e ácido ascórbico também foram realizadas.

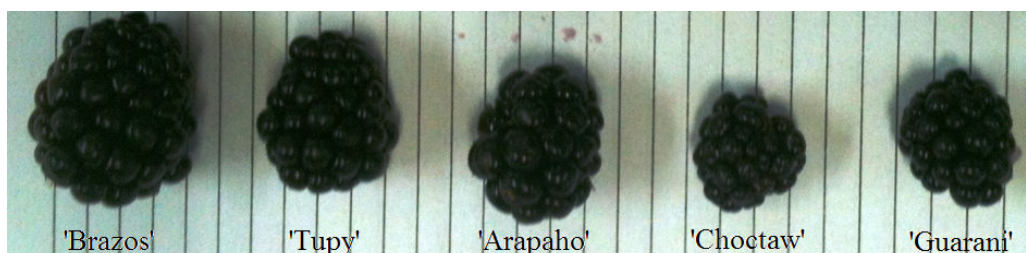


Figura 21. Frutos maduros das cinco cultivares de amoreira-preta

Fonte: CELANT, V. M., Unioeste, Campus Marechal Cândido Rondon. 2013.

Parcelas de frutos frescos e refrigerados de cada variedade foram analisadas quanto ao pH, sólidos solúveis, acidez titulável e ácido ascórbico. Outras parcelas de cada variedade foram liofilizadas, em liofilizador de bancada (LIOBRAS Liotop-L101), e armazenadas a -24 °C para as demais análises. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 repetições e 10 frutos por repetição. Foi aplicada a análise de variância e aos parâmetros significativos pelo teste F, suas médias foram comparadas pelo teste Tukey. A análise de correlação linear de *Pearson* foi aplicada. O nível de significância $p < 0,05$ foi utilizado em todas as análises. Foi utilizado o pacote estatístico SAEG (2007).

4.2.2 Composição fenólica e atividade antioxidante de amoras-pretas durante maturação

Foram avaliadas amoras-pretas ‘Brazos’ e ‘Tupy’ em três estádios de maturação estabelecidos, com base na cor visual dos frutos, em imaturo (cor rósea), intermediário (cor vermelha) e maduro (cor preta) (Figura 22 e 23). Foram avaliados os conteúdos de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas totais e a capacidade antioxidante dos frutos extraídos em etanol 80%. Análises quanto ao pH, sólidos solúveis, acidez titulável e ácido ascórbico também foram realizadas. Parcelas de frutos frescos e refrigerados de cada variedade e de cada estágio de maturação foram analisadas quanto ao pH, sólidos solúveis, acidez titulável e ácido ascórbico. Outras parcelas também de cada variedade e de cada estágio de maturação foram liofilizadas, em liofilizador de bancada (LIOBRAS Liotop-L101), e armazenadas a -24 °C para as demais análises.



Figura 22. Frutos da cultivar Brazos nos 3 estádios de maturação

Fonte: CELANT, V. M., Unioeste, Campus Marechal Cândido Rondon. 2013.



Figura 23. Frutos da cultivar Tupy nos 3 estádios de maturação

Fonte: CELANT, V. M., Unioeste, Campus Marechal Cândido Rondon. 2013.

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, num total de cinco blocos (10 frutos por bloco), com seis tratamentos constituídos pela combinação das duas cultivares e dos três estádios de maturação dos frutos. Foi aplicada a análise de variância e aos parâmetros que apresentaram efeito significativo pelo teste F, suas médias ($n=5$) foram comparadas pelo teste Tukey. A análise de correlação linear de *Pearson* foi aplicada entre as variáveis. O nível de significância a $p<0,05$ foi utilizado em todas as análises. Foi utilizado o pacote estatístico SAEG (2007).

4.2.3 Composição fenólica, capacidade antioxidante e atividade de fenilalanina amônia-liase e peroxidase de amora-preta armazenada em diferentes embalagens

Foram utilizados frutos maduros da cultivar Tupy. Parcelas individuais de 10 frutos foram acondicionadas em dois tipos de embalagens plásticas frequentemente utilizadas para armazenamento de frutos: bandeja PET (politereftalato de etileno) com dimensões internas de 16,6 x 8,5 cm e tampa de fechamento com pressão (Figura 24); e filme plástico de PVC (policloreto de vinila) esticável 18 μm (Figura 25). Para a embalagem em PVC, os frutos foram primeiramente acondicionados em bandeja de EPS (poliestireno expandido). Depois foram armazenados em câmara climatizada a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 85-90% de UR (Figura 26), e avaliados em intervalos de 1, 4 e 8 dias de armazenamento.

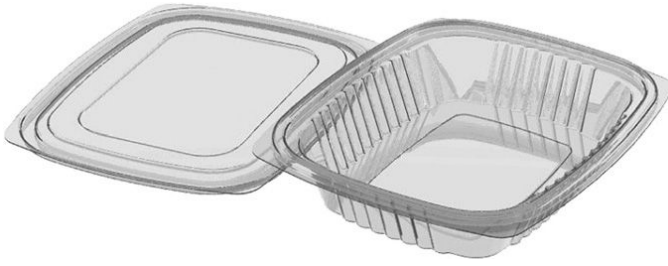


Figura 24. Embalagem plástica tipo PET (politereftalato de etileno)

Fonte: ALMENAR et al., 2008.



Figura 25. Embalagem plástica de filme PVC (policloreto de vinila) e bandeja de EPS (poliestireno expandido)

Fonte: <http://www.demux.com.br/embalagem/filme-pvc-28-cm-x-15-m.html>, 2013.



Figura 26. Armazenamento em câmara climatizada a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 85-90% de UR

Fonte: CELANT, V. M., Unioeste, Campus Marechal Cândido Rondon. 2012.

Para as avaliações em cada período, os frutos amostrados foram imediatamente avaliados quanto ao pH, sólidos solúveis, acidez titulável e ácido ascórbico, ou liofilizados em liofilizador de bancada (LIOBRAS, Liotop L101) e armazenadas a -24 °C para as demais análises.

O delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2³ (dois tipos de embalagem plástica e três períodos de armazenagem), com 4 repetições e 10 frutos por repetição foi utilizado. Foi aplicada a análise de variância e aos parâmetros que apresentaram efeito significativo pelo teste F, suas médias foram comparadas pelo teste Tukey. A análise de correlação linear de *Pearson* foi aplicada entre as variáveis. O nível de significância a $p < 0,05$ foi utilizado em todas as análises. Foi utilizado o pacote estatístico SAEG (2007).

4.3 Análises Experimentais

4.3.1 Extração

As amostras liofilizadas foram moídas em moinho de faca (AIKA A11) e depois extraídas em solvente etanólico (etanol 80% em água destilada, v/v). As extrações ocorreram adicionando 10 mL de solvente em 1 g da amostra moída, e homogeneização em Vortex por 1 minuto. Depois, os extratos foram centrifugados a 2500 g por 10 minutos e, em seguida, filtrados em filtro de papel qualitativo (15 µm) e armazenados a -24 °C. O procedimento ocorreu no escuro e em triplicata. O experimento que avaliou a composição e atividade antioxidante de cultivares de frutos de amoreira-preta extraídos em água e etanol, também teve a extração em solvente aquoso (100% água destilada). Para correção do peso seco para peso fresco parcelas de frutos foram pesados para determinação da massa fresca. Em seguida, procedeu-se a secagem em estufa a 65 °C para obtenção da matéria seca.

4.3.2 Compostos fenólicos totais

Compostos fenólicos totais foram determinados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton et al. (1999). Aliquota de 0,5 mL do extrato foi adicionada a 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu:água (10:90 v/v) e permaneceu em repouso durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL da solução carbonato de sódio:água (4:96 m/v) e deixado em repouso por 2 horas no escuro. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (BEL photonics SP-1105) a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} do peso fresco, em equivalente ácido gálico (EAG), e calculados por meio do ajuste da curva de calibração do ácido gálico em concentrações que variaram de 5,0 a 80,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 27). Análises foram realizadas em triplicata.

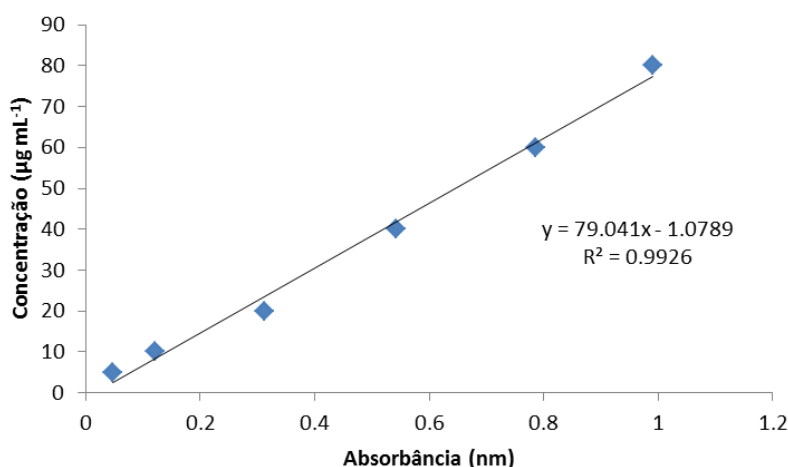


Figura 27. Curva de calibração do ácido gálico para cálculo do teor de compostos fenólicos
Fonte: CELANT, V. M., Unioeste, Campus Marechal Cândido Rondon. 2012.

4.3.3 Flavonoides totais

Foi determinado conforme Chang et al. (2002), com modificações. Em 0,5 mL do extrato foram adicionados 4,3 mL de etanol 80% em água (v/v), 0,1 mL de AlCl_3 , e 0,1 mL de acetato de potássio. Uma série controle foi realizada paralelamente adicionando etanol 80% em substituição ao AlCl_3 . Depois de 40 minutos no escuro e à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 415 nm. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} do peso fresco, em equivalente quercetina (EQ), e calculados por meio do ajuste da

curva de calibração para quercetina com concentrações que variaram de 10,0 a 66,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 28). Análises foram realizadas em triplicata.

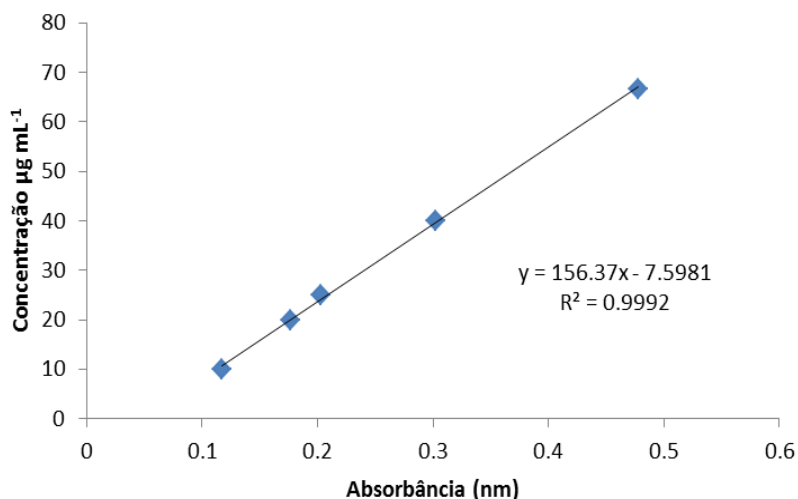


Figura 28. Curva de calibração da quercetina para cálculo do teor de flavonoides totais
Fonte: CELANT, V. M., Unioeste, Campus Marechal Cândido Rondon. 2012.

4.3.4 Antocianinas totais

O teor de antocianinas totais foi determinado pelo método do pH diferencial proposto por Giusti; Wroldstad (2003), através da solução tampão de cloreto de potássio (pH=1,0) e outra solução tampão de acetado de sódio (pH=4,5). Os extratos foram diluídos 50 vezes nas soluções tampão e deixados em repouso por 15 minutos no escuro. Após esse período, a absorbância foi medida a 510 e 700 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

A absorbância (A) final foi calculada pela fórmula:

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}$$

O teor de antocianinas totais (AT), expresso como equivalente cianidina-3-glicosídeo (ECia-3-glu), foi obtido pela fórmula:

$$\text{AT (mg } 100 \text{ g}^{-1}) = \frac{A \times \text{MM} \times \text{FD} \times 100}{\epsilon \times l} \quad (\text{Ex1})$$

A massa molar (MM) e a absorvidade molar (ϵ), utilizados para o cálculo do teor de antocianinas totais, correspondem à cianidina-3-glicosídeo (MM=449,2 g mol^{-1} e $\epsilon=26900$).

O fator de diluição (FD) foi utilizado para o resultado em peso fresco. Análises foram realizadas em triplicata.

4.3.5 Capacidade Antioxidante

4.3.5.1 Método TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

A capacidade antioxidante TEAC estima a capacidade da amostra em sequestrar o radical ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] e foi realizada conforme Re et al. (1999), com modificações. O radical ABTS foi formado pela reação de 140,0 mmol L⁻¹ de persulfato de potássio com 7,0 mmol L⁻¹ de ABTS, no escuro em temperatura ambiente, por 16 horas. Depois, o radical ABTS foi diluído com etanol P.A. até a obtenção do valor de absorvância entre 0,700 e 0,734 ($\pm 0,05$). Foi adicionado 30 μ L do extrato em 3,0 mL do radical ABTS e deixado por 6 minutos no escuro. A leitura foi realizada a 734 nm e o etanol foi utilizado como branco. A curva padrão foi ajustada com Trolox [6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico] nas concentrações que variaram de 0,02 a 0,50 μ g mL⁻¹ (Figura 29). Os resultados foram calculados de acordo com a equação ajustada da curva padrão e expressos em μ g g⁻¹ do peso fresco, em equivalente Trolox (ET). Análises foram realizadas em triplicata.

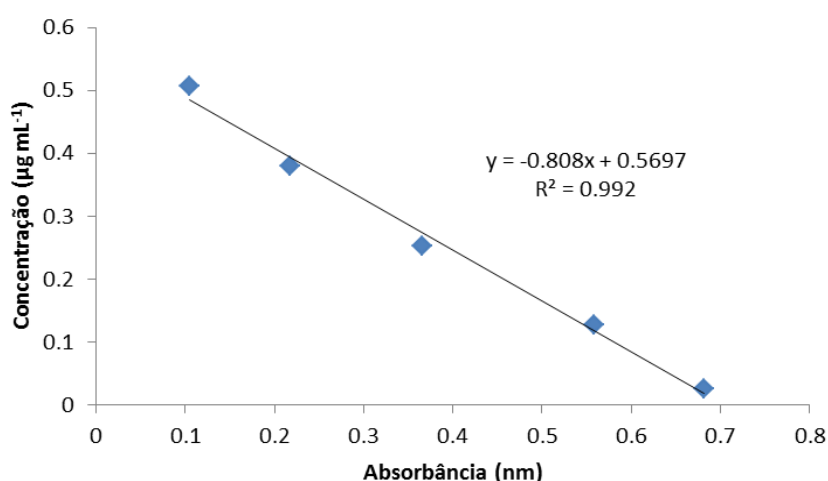


Figura 29. Curva de calibração do trolox para cálculo da capacidade antioxidante pelo método TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

Fonte: CELANT, V. M., Unioeste, Campus Marechal Cândido Rondon. 2012.

4.3.5.2 Método DPPH

A capacidade antioxidante dos extratos, medida por meio da sua capacidade de sequestro de radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), foi determinada conforme De Ancos et al. (2002). Em 3,0 mL de etanol foram adicionados 0,5 mL do extrato e 0,3 mL da solução de DPPH ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e deixado em repouso por 60 minutos no escuro. Depois, a absorbância foi lida a 517 nm. O controle, contendo 3,5 mL de etanol e 0,3 mL da solução de DPPH, foi utilizado. Resultados foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ do peso fresco, em equivalente Trolox (ET), calculados por meio do ajuste da curva de calibração para Trolox nas concentrações que variaram de 20,0 a 140,0 $\mu\text{M mL}^{-1}$ (Figura 30).

A (%) da capacidade antioxidante também foi calculada pela fórmula:

$$(\%)\text{AAT} = \frac{\text{leitura controle} - \text{leitura amostra}}{\text{leitura controle}} \times 10$$

Adicionalmente, a capacidade antioxidante dos padrões ácido ascórbico, ácido gálico e pirocatequina também foi determinada. Análises foram realizadas em triplicata.

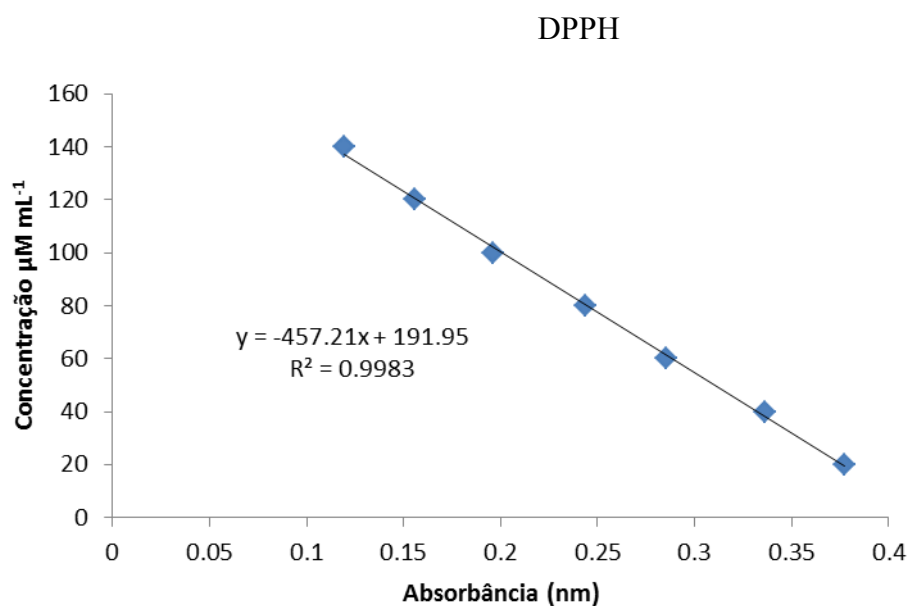


Figura 30. Curva de calibração do trolox o cálculo da capacidade antioxidante pelo método DPPH

Fonte: CELANT, V. M., Unioeste, Campus Marechal Cândido Rondon. 2012.

4.3.6 Perda de massa fresca, sólidos solúveis, acidez titulável, *ratio*, pH e ácido ascórbico

A perda de massa fresca foi obtida por gravimetria, em balança de precisão 0,01 g, e os resultados, expressos em porcentagem, estimados a partir das diferenças de massa das unidades experimentais entre o momento da instalação do experimento e o dia da avaliação final. As amostras de frutas foram inicialmente homogeneizadas em triturador mecânico (Philips RI-1364) e depois filtradas em algodão hidrofóbico. O pH foi determinado em medidor de bancada (Adwa AD-1000). O conteúdo de sólidos solúveis foi determinado em refratômetro de bancada (Quimis QI-107.1), e expressos em °Brix. A acidez titulável foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH 0,1 mol L⁻¹) e fenolftaleína 1% (v/v) como indicador, com resultados expressos em g 100 g⁻¹ do peso fresco, em equivalente ácido cítrico (AOAC, 1995). O *ratio* foi obtido através da razão °Brix/acidez titulável, determinados conforme descrito anteriormente. O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado por titulação com 2,6-diclorofenol-indofenol (BENASSI; ANTUNES, 1988) e os resultados expressos em mg 100 g⁻¹ do peso fresco. Todas as análises foram feitas em triplicata.

4.3.7 Atividade enzimática

4.3.7.1 Obtenção da preparação enzimática

As amostras liofilizadas foram homogeneizadas em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹ (pH=6,0) (tampão de extração) em almofariz de porcelana previamente resfriado e acrescentado 0,04 g de polivinil pirrolidona durante a maceração. O homogeneizado foi centrifugado a 14.500 rpm durante 20 min. O sobrenadante obtido, considerado como a fração contendo as proteínas solúveis, foi armazenado a 4 °C para posteriores análises bioquímicas (LUSSO; PASCHOLATI, 1999).

4.3.7.2 Peroxidase (POD)

A atividade de peroxidases foi determinada a 30 °C, através do método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A mistura da solução consistiu de 2,9 mL do substrato para enzima (306 µL de peróxido de hidrogênio, 12,5 mL de guaiacol 2% alcoólico (v/v) e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ (pH=6,0)) e 0,1 mL de preparação enzimática. A cubeta de referência continha 3 mL do substrato para enzima. A reação foi conduzida em espectrofotômetro a 470 nm, por 2 min, com as medidas de densidade óptica tomadas a cada 15 s, iniciando-se logo após a adição da preparação enzimática ao substrato. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em variação (Δ = delta) de unidade de absorvância A min⁻¹ g⁻¹ (p.f.).

4.3.7.3 Fenilalanina amônia-liase

Foi determinada adicionando 0,5 mL do extrato enzimático em tubos de ensaio e acrescentado 2,0 mL de solução tampão TRIS-EDTA (0,5 mol L⁻¹, pH=8,5), e 0,5 mL de solução de fenilalanina (300 µmol L⁻¹), sendo incubado em banho-maria a 40 °C, por 1 hora. O “branco” foi preparado usando-se água destilada em vez da fenilalanina para cada tratamento testado. As análises foram realizadas em triplicata. Após a incubação, os tubos foram transferidos imediatamente para banho de gelo, com o objetivo de encerrar a reação. As leituras espectrofotométrica foram realizadas a 290 nm e os resultados foram expressos em mg de ácido trans-cinâmico h⁻¹ mg⁻¹ (p.f.) (UMESHA, 2006).

4.3.8 Degradação pós-colheita

A avaliação do índice de degradação foi realizada subjetivamente, através de exame visual utilizando um índice numérico de escalas de notas variando de 0 a 5, onde: 0 = frutos totalmente lisos, 1 = até 20% dos frutos apresentando enrugamento; 2 = até 40% dos frutos apresentando enrugamento; 3 = até 60% dos frutos apresentando enrugamento, 4 = até 80% dos frutos apresentando enrugamento e 5 = até 100% dos frutos

apresentando enrugamento, para um total de dez frutos avaliados por repetição / por tratamento, segundo metodologia adaptada de HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., (2008).

4.3.9 Identificação dos fungos

A identificação dos fungos foi feita por microscopia segundo Franco; Landgraf (1996).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Capítulo 1: Composição Fenólica e Atividade Antioxidante de Frutos de Amoreira-preta Extraídos em Água e Etanol

5.1.1 Compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides

Os conteúdos totais de compostos fenólicos das cultivares de amora-preta extraídas com etanol 80% e água (v/v) são apresentados na Tabela 5. O conteúdo de compostos fenólicos totais variou de 8,47 a 11,66 mg EAGg⁻¹ (p.f.) na extração aquosa, e de 8,23 a 14,98 mg g⁻¹ na etanólica, mas em ambos os solventes de extração ‘Arapaho’ foi superior e exibiu conteúdos de 11,66±0,05 e 14,98±0,54 mg EAG g⁻¹ (p.f.), respectivamente nos extratos aquoso e etanólico. Hassimotto et al. (2008) avaliaram as cultivares Guarani, Brazos e Tupy produzidas no sul de Minas Gerais (Brasil) e encontraram conteúdos inferiores de compostos fenólicos totais (3,41, 4,27 e 3,73 mg EAG g⁻¹, p.f., respectivamente).

Tabela 5. Compostos fenólicos das cinco cultivares de amora-preta, extraídos com solvente aquoso e etanólico. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Cultivar	Compostos fenólicos totais mg EAG g ⁻¹ (p.f.)	
	H ₂ O	EtOH 80%
Brazos	8,77 ± 0,07 ^{aC}	8,23 ± 0,16 ^{bE}
Tupy	9,51 ± 0,11 ^{aB}	8,88 ± 0,06 ^{bD}
Arapaho	11,66 ± 0,05 ^{bA}	14,98 ± 0,54 ^{aA}
Choctaw	9,81 ± 0,09 ^{aB}	9,67 ± 0,25 ^{aC}
Guarani	8,47 ± 0,16 ^{bC}	12,55 ± 0,38 ^{aB}

Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem a $p < 0,05$ pelo teste Tukey. Médias ± desvio padrão (n=5)

EAG: equivalente ácido gálico

P.f.: peso fresco

O etanol 80% foi superior à água na extração de compostos fenólicos totais para ‘Arapaho’ e ‘Guarani’, mas foi inferior para ‘Brazos’ e ‘Tupy’, e não houve diferenças significativas entre os solventes para ‘Choctaw’. Isto sugere que a eficiência dos solventes água e etanol 80% na extração de compostos fenólicos totais é dependente da cultivar de amora-preta. Em adição, há indícios de que entre as amoras analisadas existem diferentes

concentrações de grupos fenólicos com diferentes polaridades. Foi relatado que a eficiência de extração de solventes depende da afinidade polar entre solvente e compostos fenólicos da amostra (BAYDAR et al., 2004; HAYOUNI et al., 2007; WANG et al., 2009; IGNAT et al., 2011).

O etanol 80% foi significativamente mais eficiente para extrair antocianinas totais do que a água em todas as cultivares de amora-preta analisadas (Tabela 6). A maior eficiência do etanol para extrair antocianinas, comparado à água, foi demonstrado também por outros autores (JU; HOWARD, 2003; LAPORNIK et al., 2005; VATAI et al., 2009). O etanol tem sido o solvente de extração mais recomendado devido a sua baixa toxicidade, comparado, por exemplo, ao metanol (IGNAT et al., 2011).

Tabela 6. Antocianinas e flavonoides totais das cinco cultivares de amora-preta, extraídos com solvente aquoso e etanólico. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Cultivar	Antocianinas totais mg ECia-3-glu g ⁻¹ (p.f.)		Flavonoides totais mg EQ g ⁻¹ (p.f.)
	H ₂ O	EtOH 80%	EtOH 80%
Brazos	3,86 ± 0,01 ^{bb}	7,02 ± 0,02 ^{ad}	0,46 ± 0,02 ^D
Tupy	3,18 ± 0,01 ^{bc}	6,76 ± 0,03 ^{ae}	0,86 ± 0,02 ^C
Arapaho	4,36 ± 0,02 ^{ba}	8,36 ± 0,02 ^{ac}	0,85 ± 0,01 ^C
Choctaw	3,21 ± 0,02 ^{bc}	9,42 ± 0,03 ^{aa}	0,92 ± 0,01 ^B
Guarani	2,57 ± 0,01 ^{bd}	8,45 ± 0,03 ^{ab}	1,14 ± 0,01 ^A

Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem a $p < 0,05$ pelo teste Tukey. Médias ± desvio padrão (n=5)

ECia-3-glu: equivalente Cianidina-3-glucosídeo

EQ: equivalente quercetina

P.f.: peso fresco

A extração com água exibiu antocianinas totais variando de 2,57 ± 0,01 mg ECia-3-glu g⁻¹, p.f. ('Guarani') a 4,36 ± 0,02 mg ECia-3-glu g⁻¹, p.f. ('Arapaho') (Tabela 6). 'Choctaw' exibiu o maior conteúdo de antocianinas totais (9,42 ± 0,03 mg ECia-3-glu g⁻¹, p.f.) na extração com etanol 80%, e 'Tupy' exibiu o menor (6,76 ± 0,03 mg ECia-3-glu g⁻¹, p.f.). Comparado a este estudo Hassimotto et al. (2008) encontraram menor conteúdo de antocianinas totais em amoras-pretas 'Guarani', 'Brazos' e 'Tupy' (1,94, 1,33 e 1,16 mg ECia-3-glu g⁻¹, p.f., respectivamente). Também, menor conteúdo de antocianinas totais extraídas em etanol foi encontrado por Koca; Karadeniz (2009) em amora-preta 'Arapaho' (1,15 mg Ci-3-Glu g⁻¹ p.f.) produzida na região do Mar Negro da Turquia, e por Pantelidis et al. (2007) em amora-preta 'Choctaw' (1,256 mg ECia-3-glu g⁻¹, p.f.) produzida no norte da Grécia. Diversos autores relataram que

genótipo e condições ambientais estão entre os fatores que causam grandes variações na composição química de frutas (CHO et al., 2004; FAN-CHIANG; WROLSTAD, 2005; CONNOR et al., 2005). Em condições climáticas tropicais ou subtropicais (típicas das regiões brasileiras) os períodos prolongados de muita seca ou muita chuva, níveis de radiação elevados e temperaturas extremas causam estresses ambientais. Tais estresses podem aumentar a produção de antioxidantes fenólicos como mecanismo da planta para desintoxicar as células dos elevados níveis de radicais livres (espécies reativas de oxigênio) produzidos devido a estresses oxidativos ambientais (HODGES, 2003; ATKINSON et al., 2005), refletindo em variações do conteúdo de compostos fenólicos em espécies produzidas em diferentes regiões.

Flavonoides totais extraídos com água não são apresentados, pois houve turvação das amostras, levando a erros na leitura de absorvância. Entretanto, na extração com etanol 80% (Tabela 6) ‘Guarani’ apresentou o maior conteúdo de flavonoides totais ($1,14 \pm 0,01$ mg EQ g⁻¹ p.f.) e ‘Brazos’ o menor conteúdo ($0,46 \pm 0,02$ mg EQ g⁻¹ p.f.). Em pesquisa similar, Hassimotto et al. (2008) também encontraram conteúdo de flavonoides totais superior em amora-preta ‘Guarani’, comparado a ‘Brazos’ e ‘Tupy’. Vários estudos têm sugerido o benefício potencial para a saúde relacionado ao consumo de flavonoides (BEATTIE et al., 2005; HE; GIUSTI, 2010). Flavonoides agem como varredores de radicais livres, por quelação dos íons de metais ou pela supressão das reações de formação de espécies de oxigênio reativo, podendo ainda regular defesas antioxidantes endógenas (PIETTA, 2000).

5.1.2 Capacidade antioxidante

Os resultados de capacidade antioxidante TEAC das cultivares de amora-preta extraídas em água e etanol 80% são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Capacidade antioxidante TEAC dos extratos aquoso e etanólico dos frutos das cinco cultivares de amora-preta. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Cultivar	TEAC μg ET g ⁻¹ (p.f.)	
	H ₂ O	EtOH 80%
Brazos	25,84 ± 0,05 ^{aB}	15,15 ± 0,03 ^{bC}
Tupy	21,10 ± 0,30 ^{aE}	15,47 ± 0,06 ^{bC}
Arapaho	35,15 ± 0,16 ^{aA}	21,99 ± 0,25 ^{bA}
Choctaw	23,82 ± 0,10 ^{aC}	17,26 ± 0,36 ^{bB}
Guarani	22,91 ± 0,08 ^{aD}	15,16 ± 0,67 ^{bC}

Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem a $p < 0,05$ pelo teste Tukey. Médias ± desvio padrão (n=5)

ET: equivalente trolox

P.f.: peso fresco

Para todas as cultivares testadas, a extração com água exibiu maior capacidade de sequestro do radical ABTS (TEAC) do que o etanol 80%. Entretanto, resultado inverso foi verificado para o método DPPH (Tabela 8). Estes resultados sugerem que compostos extraídos com solvente de elevada polaridade (água) possuem maior habilidade para neutralizar o radical ABTS, mas são menos eficazes para neutralizar o radical DPPH. Contrariamente, solvente de menor polaridade (etanol) extrai compostos com maior eficiência para neutralizar o radical DPPH, mas menos eficazes para neutralizar o radical ABTS. Em adição, fitoquímicos antioxidantes de diferentes polaridades podem estar presentes em extratos com elevada capacidade antioxidante. Foi relatado que mudanças de polaridade do solvente modificam a capacidade do solvente para dissolver um grupo selecionado de compostos antioxidantes, e isso interfere na estimativa de capacidade antioxidante destes compostos (HAYOUNI et al., 2007).

Diferenças estatísticas para capacidade antioxidante foram encontradas entre cultivares de amora-preta (Tabela 8), concordando com Scalzo et al. (2005) em estudo similar. Independente do solvente utilizado neste trabalho, ‘Arapaho’ apresentou a maior capacidade antioxidante para ambos os ensaios TEAC e DPPH. Entre os antioxidantes padrões (ácido ascórbico, ácido gálico e pirocatequina), o ácido gálico apresentou a maior eficiência de reduzir o radical DPPH, mas foi significativamente menos eficiente do que a amora-preta ‘Arapaho’. Isto sugere que ‘Arapaho’ é o material genético com maior atividade biológica entre as amostras testadas. O ácido ascórbico não mostrou habilidade em neutralizar o radical DPPH, e foi muito inferior do que as demais amostras testadas. Hassimotto et al. (2008) encontraram que as eficiências de inibição do radical DPPH (%CA do extrato etanólico) das amoras-pretas ‘Brazos’, ‘Tupy’ e ‘Guarani’ foram

66, 71 e 76%, respectivamente, e essa tendência foi similar aos resultados encontrados neste estudo.

Tabela 8. Capacidade antioxidante DPPH dos extratos aquoso e etanólico dos frutos das cinco cultivares de amora-preta. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Cultivar	DPPH mg ET g ⁻¹ (p.f.)		DPPH % CA	
	H ₂ O	EtOH 80%	H ₂ O	EtOH 80%
Brazos	78,15 ± 0,79 ^{bd}	91,52 ± 0,53 ^{ad}	48,83 ± 0,31 ^{bd}	53,13 ± 0,21 ^{ad}
Tupy	65,80 ± 2,03 ^{bf}	96,81 ± 0,31 ^{ac}	43,18 ± 0,81 ^{bf}	55,60 ± 0,12 ^{ac}
Arapaho	125,72 ± 0,55 ^{ba}	137,69 ± 0,82 ^{aa}	70,62 ± 0,22 ^{ba}	74,68 ± 0,33 ^{aa}
Choctaw	74,81 ± 2,17 ^{be}	100,85 ± 0,94 ^{ab}	47,30 ± 0,86 ^{be}	57,48 ± 0,38 ^{ab}
Guarani	63,10 ± 0,57 ^{bf}	101,35 ± 1,18 ^{ab}	41,94 ± 0,22 ^{bf}	57,72 ± 0,48 ^{ab}
<i>Padrões antioxidantes</i>				
Ácido gálico	118,57 ± 0,59 ^B		67,77 ± 0,26 ^B	
Pirocatequina	83,13 ± 0,53 ^C		52,21 ± 0,23 ^C	
Ácido ascórbico	3,35 ± 1,15 ^G		17,17 ± 0,50 ^G	

Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem a $p < 0,05$ pelo teste Tukey. Médias ± desvio padrão (n=5)

ET: equivalente trolox

CA: capacidade antioxidante

P.f.: peso fresco

Os valores de capacidade antioxidante DPPH e TEAC das cultivares de amora-preta foram correlacionados positivamente com fenólicos totais para ambas as extrações com água (0,89 e 0,81, respectivamente) e etanol 80% (0,88 e 0,75, respectivamente) (Tabela 9), sugerindo que entre 75 e 89% da capacidade antioxidante dos extratos é devida à presença de compostos fenólicos. Correlação linear positiva entre capacidade antioxidante e fenólicos totais de amoras-pretas tem sido relatada por outros autores (WANG; LIN, 2000; YU et al., 2005; HAYOUNI et al., 2007; KOCA; KARADENIZ, 2009).

Tabela 9. Coeficientes de correlação linear de *Pearson* entre capacidade antioxidante e composição fenólica para os extratos aquoso e etanólico das amoras-pretas ‘Brazos’ e ‘Tupy’. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Variáveis	Fenólicos totais	Antocianinas	Flavonoides
Extrato aquoso			
DPPH	0,89**	0,87**	-
TEAC	0,81**	0,84**	-
Extrato etanólico			
DPPH	0,88**	0,34 ^{ns}	0,21 ^{ns}
TEAC	0,75**	0,39*	0,06 ^{ns}

** p<0,01. * p<0,05. ^{ns} não significativo a p<0,05

Para a extração aquosa, correlações lineares positivas foram verificadas entre capacidades antioxidantes e antocianinas totais (0,87 e 0,84, respectivamente para DPPH e TEAC) (Tabela 9). Entretanto, para a extração com etanol 80% não houve correlação entre capacidade antioxidante e antocianinas totais, sugerindo que antocianinas tem menos influência na capacidade antioxidante das amoras-pretas do que outros grupos fenólicos. Resultados similares foram relatados também por outros pesquisadores (WANG; LIN, 2000; PANTELIDIS et al., 2007; KOCA; KARADENIZ, 2009). Da mesma forma, não houve correlação entre capacidade antioxidante e flavonoides totais das amoras extraídas com etanol 80%. Diversas explicações para a relação entre capacidade antioxidante e compostos fenólicos revelam que nem todos os grupos fenólicos incorporam capacidade antioxidante expressiva, mas quando possuem essa propriedade atuam como agentes redutores, doadores de hidrogênio e supressores do oxigênio singlete e triplete (PIETTA, 2000), podendo ainda exibir propriedades de quelação de metais (SAITO et al., 2008).

5.1.3 Características químicas

De acordo com a Tabela 10, maior e menor teores de ácido ascórbico foram encontrados nas cultivares Brazos e Choctaw ($134,09 \pm 1,31$ e $87,87 \pm 2,14$ mg 100 g⁻¹, respectivamente). Barcia et al. (2010) avaliaram diferentes cultivares de amora-preta e encontraram conteúdo de ácido ascórbico de 75,7 mg 100 g⁻¹ para ‘Tupy’ em análise com HPLC. Pantelidis et al. (2007) avaliaram cultivares de amora-preta produzidas no norte da Grécia e encontraram conteúdos de ácido ascórbico que variaram de 14,3 a 17,5 mg 100 g⁻¹ (p.f.), com ‘Choctaw’ apresentando 14,6 mg 100 g⁻¹ (p.f.), sendo esses resultados inferiores aos deste estudo. Deighton et al. (2000) encontraram em cultivares selvagens e domesticadas de amoras-pretas produzidas em Corvallis, Oregon, EUA, conteúdos de ácido ascórbico que variaram de 12,3 a 16,4 mg 100 g⁻¹ (p.f.).

Sólidos solúveis variaram de $6,78 \pm 0,05$ °Brix (‘Choktaw’) a $9,70 \pm 0,05$ °Brix (‘Tupy’) e a acidez titulável variou de $1,11 \pm 0,03$ g EAC 100 g⁻¹ (‘Tupy’) a $1,37 \pm 0,02$ g EAC 100 g⁻¹ (‘Guarani’) (Tabela 10). A amora-preta ‘Tupy’ apresentou a maior razão entre sólidos solúveis / acidez titulável ($8,74 \pm 0,23$) e isso indica seu melhor sabor, comparado às outras cultivares. ‘Guarani’ e ‘Chocraw’ apresentaram a menor relação sólidos solúveis/acidez titulável ($5,24 \pm 0,08$), indicando sabor mais ácido e, conseqüentemente, menos agradável. A acidez e os açúcares solúveis são importantes parâmetros utilizados para

o mercado de amoras e pode servir como referência para classificar polpas de frutas para a produção de sucos. A proporção entre açúcares e ácidos orgânicos tem sido relacionada como parâmetro de qualidade do sabor entre cultivares (SHAW, 1988), podendo ser utilizada também como parâmetro de colheita (CORDENUNSI et al., 2002).

Tabela 10. Caracterização química dos frutos frescos das cultivares de amora-preta. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Cultivar	Ácido ascórbico mg 100 g ⁻¹	Sólidos solúveis °Brix	Acidez titulável g EAC 100 g ⁻¹	Sólidos solúveis / acidez titulável
Brazos	134,09 ± 1,31 ^a	7,51 ± 0,06 ^c	1,28 ± 0,02 ^b	5,85 ± 0,08 ^c
Tupy	114,39 ± 3,30 ^b	9,70 ± 0,05 ^a	1,11 ± 0,03 ^c	8,74 ± 0,23 ^a
Arapaho	96,96 ± 3,03 ^{cd}	8,92 ± 0,04 ^b	1,26 ± 0,02 ^b	7,08 ± 0,10 ^b
Choctaw	87,87 ± 2,14 ^d	6,78 ± 0,05 ^e	1,23 ± 0,02 ^b	5,49 ± 0,14 ^d
Guarani	100,00 ± 6,44 ^c	7,17 ± 0,02 ^d	1,37 ± 0,02 ^a	5,24 ± 0,08 ^d

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem a $p < 0,05$ pelo teste Tukey. Médias ± desvio padrão (n=5).

EAC: equivalente ácido cítrico

5.1.4 Conclusões

A eficiência de extração para compostos fenólicos totais entre os solventes aquoso e etanólico foi dependente da cultivar de amora-preta. Para ambos os solventes de extração, ‘Arapaho’ exibiu conteúdo de compostos fenólicos totais superior às demais cultivares. Etanol 80% foi mais eficiente na extração de antocianinas totais do que a água. A cultivar Guarani apresentou o maior conteúdo de flavonoides totais. A eficiência de sequestro dos radicais ABTS e DPPH foi dependente do solvente utilizado na extração, com maior capacidade antioxidante TEAC nos extratos aquosos e maior capacidade antioxidante DPPH nos extratos etanólicos. Independente do solvente de extração, ‘Arapaho’ apresentou a maior capacidade antioxidante. Houve forte correlação positiva entre compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, mas os resultados não suportam evidências de associação entre atividade antioxidante das amoras-pretas estudadas e conteúdos totais de antocianinas ou flavonoides. ‘Brazos’ apresentou o maior conteúdo de ácido ascórbico e ‘Choctaw’ o menor. A relação entre sólidos solúveis e acidez titulável revelou que a amora-preta ‘Tupy’ é a mais saborosa e que ‘Guarani’ e ‘Choctaw’ possui o sabor mais ácido.

5.2 Capítulo 2: Composição Fenólica e Atividade Antioxidante de Amoras-pretas Durante Maturação

5.2.1 Compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides

De acordo com a Tabela 11, os maiores teores de compostos fenólicos totais foram observados nos frutos imaturos ($7,99 \pm 0,25$ e $5,19 \pm 0,20$ mg EAG g⁻¹ do p.f., respectivamente para ‘Brazos’ e ‘Tupy’). Entretanto, o avanço da maturação fisiológica refletiu em diminuições significativas do conteúdo de compostos fenólicos totais quando as amoras atingiram o estágio intermediário ($2,35 \pm 0,13$ e $2,78 \pm 0,16$ mg EAG g⁻¹ do p.f., respectivamente para ‘Brazos’ e ‘Tupy’), seguidas de acréscimos no estágio maduro ($4,20 \pm 0,10$ e $4,48 \pm 0,09$, mg EAG g⁻¹ do peso fresco, respectivamente), demonstrando que embora o controle genético seja um dos principais fatores na composição de fenólicos em frutas e hortaliças, as variações também dependem da maturação no momento da colheita (MACHEIX et al., 1990; DUMAS et al., 2003).

Tabela 11. Compostos fenólicos das amoras-pretas ‘Brazos’ e ‘Tupy’ em três estádios de maturação. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Estádio de maturação	Compostos fenólicos totais mg EAG g ⁻¹ (p.f.)	
	‘Brazos’	‘Tupy’
Imaturo	$7,99 \pm 0,25^a$	$5,19 \pm 0,20^a$
Intermediário	$2,35 \pm 0,13^c$	$2,78 \pm 0,16^c$
Maduro	$4,20 \pm 0,10^b$	$4,48 \pm 0,09^b$

Médias seguidas pela mesma letra não diferem a $p < 0,05$ pelo teste Tukey. Médias \pm desvio padrão (n=5).

EAG: Equivalente ácido gálico

P.f.: Peso fresco

Os aumentos no conteúdo de fenólicos observados do estágio intermediário para o maduro podem ter ocorrido devido às antocianinas que tiveram altas taxas de acréscimos neste intervalo de maturação. Resultados semelhantes foram verificados em amoras-pretas ‘Marion’ e ‘Evergreen’ por Siriwoharn et al. (2004) e em ‘Chester Thornless’, ‘Hull Thornless’ e ‘Triple Crown Thornless’ por Wang; Lin (2000), que também verificaram este mesmo comportamento em framboesa negra ‘Jewel’ e em morangos ‘Allstar’.

Adicionalmente, Castrejón et al. (2008) e Kalt et al. (2003) observaram redução no teor de compostos fenólicos totais em cultivares de mirtilo durante a maturação dos frutos.

Acréscimos no conteúdo de antocianinas totais de ambas as cultivares de amora-preta foram verificados, como esperado (Tabela 12), com valores de $710,40 \pm 3,87$ e $696,69 \pm 5,09$ mg ECia-3-glu 100 g^{-1} (p.f.) no estágio maduro, respectivamente para ‘Brazos’ e ‘Tupy’. O maior teor de antocianinas no estágio maduro é justificado pela síntese destes pigmentos que ocorre durante o seu amadurecimento, atingindo o valor máximo no fruto completamente maduro (TAIZ; ZEIGER, 2004). Variações similares no conteúdo de antocianinas durante a maturação de amoras-pretas também foram verificadas por Siriwoharn et al. (2004) nas cultivares Marion e Evergreen, e por Wang; Lin (2000) nas cultivares Chester Thornless, Hull Thornless e Triple Crown Thornless. No entanto, esses autores encontraram, para essas cultivares, conteúdos de antocianinas totais nos frutos maduros inferiores aos verificados neste trabalho, os quais variaram de 133,5 a 317,0 mg 100 g^{-1} (p.f.). Esse aumento nos teores de antocianina, decorrente do amadurecimento do fruto, também foi observado em frutos de framboesa preta ‘Jewel’ ($1,7 \pm 0,6$ em frutos verdes, $22,8 \pm 5,4$ em frutos vermelhos e $197,2 \pm 3,5$ mg 100 g^{-1} do peso fresco em frutos maduros) e em frutos de framboesa vermelha ‘Summit’ ($2,2 \pm 0,6$ em frutos verdes, $15,9 \pm 1,2$ em frutos vermelhos e $99,5 \pm 3,8$ mg 100 g^{-1} do peso fresco em frutos maduros) no mesmo trabalho realizado por Wang; Lin (2000). Com base nos resultados, pode-se considerar que frutos de amoreira-preta ‘Brazos’ e ‘Tupy’ são melhores fontes de antocianinas que framboesas vermelhas ‘Summit’ e framboesa negra ‘Jewel’.

Tabela 12. Antocianinas e flavonoides totais das amoras-pretas ‘Brazos’ e ‘Tupy’ em três estádios de maturação. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Estádio de maturação	Antocianinas totais mg ECia-3-glu 100 g^{-1} (p.f.)		Flavonoides totais mg EQ g^{-1} (p.f.)	
	‘Brazos’	‘Tupy’	‘Brazos’	‘Tupy’
Imaturo	$9,77 \pm 0,62^c$	$1,51 \pm 0,08^c$	$0,18 \pm 0,02^c$	$0,64 \pm 0,04^b$
Intermediário	$59,78 \pm 0,39^b$	$7,06 \pm 0,04^b$	$0,56 \pm 0,02^a$	$0,17 \pm 0,01^c$
Maduro	$710,40 \pm 3,87^a$	$696,69 \pm 5,09^a$	$0,47 \pm 0,01^b$	$0,87 \pm 0,01^a$

Médias seguidas pela mesma letra não diferem a $p < 0,05$ pelo teste Tukey. Médias \pm desvio padrão (n=5).

ECia-3-glu: Equivalente cianidina-3-glucosídeo

EQ: Equivalente quercetina

P.f.: Peso fresco

Antocianinas representam um dos maiores grupos de compostos fenólicos presentes na dieta humana. Adicionando frutos como a amora-preta a uma dieta equilibrada é possível obter resultados mais eficazes e econômicos do que o consumo de um antioxidante individual específico, como ácido ascórbico ou vitamina A ou E na proteção do organismo contra stresses oxidativos (KUHNAU, 1976). Rice-Evans et al. (1996) afirmaram que o potencial antioxidante total de frutas e verduras é mais importante do que os níveis de qualquer componente antioxidante individual específico.

Com relação aos flavonoides totais das amoras-pretas (Tabela 12), ‘Brazos’ exibiu conteúdo estatisticamente superior no estágio intermediário ($0,56 \pm 0,02$ mg EQ g⁻¹), enquanto ‘Tupy’, no mesmo estágio, apresentou o menor conteúdo ($0,17 \pm 0,01$ mg EQ g⁻¹). Esses resultados sugerem que não há relação direta entre conteúdo de flavonoides totais e maturação das amoras estudadas. Entretanto, Acosta-Montoya et al. (2010) verificaram diminuições significativas no conteúdo de flavonoides totais durante a maturação da amora-preta ‘Tropical Highland’, em três estádios distintos, sendo encontrado no estágio 1 (frutos de coloração vermelha) teor de flavonoides de $0,298 \pm 0,002$ mg EQ g⁻¹, em frutos de coloração roxa, denominada de estágio 2, $0,231 \pm 0,004$ mg EQ g⁻¹, e em frutos no estágio 3, pretos, o valor foi ainda menor, $0,137 \pm 0,002$ mg EQ g⁻¹ (p.f.).

5.2.2 Capacidade antioxidante

A atividade antioxidante, expressa pela capacidade dos extratos das amoras em sequestrar o radical ABTS, método TEAC, é apresentada na Tabela 13.

Tabela 13. Capacidade antioxidante TEAC das amoras-pretas ‘Brazos’ e ‘Tupy’ em três estádios de maturação. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Estádio de maturação	ABTS μg ET 100 g ⁻¹ (p.f.)	
	‘Brazos’	‘Tupy’
Imaturo	$11,13 \pm 0,56$ ^b	$8,97 \pm 0,33$ ^b
Intermediário	$11,23 \pm 0,30$ ^b	$8,62 \pm 0,22$ ^b
Maduro	$14,96 \pm 0,53$ ^a	$14,73 \pm 0,58$ ^a

Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem a $p < 0,05$ pelo teste Tukey. Médias \pm desvio padrão (n=5)

ET: Equivalente trolox

p.f.: Peso fresco

A capacidade de sequestro do radical ABTS das cultivares Tupy e Brazos foram significativamente superiores no estágio maduro, mas não apresentaram diferenças significativas entre os estádios imaturo e intermediário. Entretanto, para o ensaio DPPH (Tabela 14), ‘Tupy’ apresentou atividade antioxidante superior no estágio maduro, similar ao resultado do ensaio ABTS, enquanto para ‘Brazos’ a atividade antioxidante DPPH foi estatisticamente superior no estágio imaturo. Wang; Lin (2000), em estudos com atividade antioxidante ORAC de diferentes cultivares de amora-preta em três estádios da maturação, verificaram variações similares a este trabalho. Hassimotto et al. (2008) em estudos com frutos maduros das cultivares Brazos e Tupy, verificaram resultados de % de inibição do radical DPPH superiores aos encontrados neste estudo, com valores de 66% para ‘Brazos’, 71% para ‘Tupy’.

Tabela 14. Capacidade antioxidante DPPH das amoras-pretas ‘Brazos’ e ‘Tupy’ em três estádios de maturação. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Estádio de maturação	DPPH mg ET g ⁻¹ (p.f.)		DPPH %	
	‘Brazos’	‘Tupy’	‘Brazos’	‘Tupy’
Imaturo	10,26 ± 0,20 ^a	8,28 ± 0,12 ^b	58,29 ± 0,95 ^a	49,06 ± 0,58 ^b
Intermediário	5,59 ± 0,34 ^c	4,98 ± 0,19 ^c	36,50 ± 1,60 ^c	22,05 ± 0,44 ^c
Maduro	8,83 ± 0,09 ^b	9,84 ± 0,26 ^a	51,62 ± 0,43 ^b	56,35 ± 1,22 ^a

Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem a $p < 0,05$ pelo teste Tukey. Médias ± desvio padrão (n=5)

ET: Equivalente trolox

p.f.: Peso fresco

Correlações significativas foram verificadas entre atividade antioxidante DPPH e conteúdo de compostos fenólicos totais, com coeficientes de 0,91 e 0,87, respectivamente para ‘Brazos’ e ‘Tupy’ (Tabela 15), ou seja, há indícios de que 91 e 87 % das variações na atividade antioxidante DPPH podem ser explicadas pelo conteúdo de compostos fenólicos totais dessas cultivares. Entretanto, não houve correlação entre ABTS e fenólicos totais. Estes resultados sugerem que em ambas as cultivares estudadas os níveis de compostos fenólicos totais foram altamente influentes na atividade antioxidante DPPH, mas não contribuíram com o sequestro do radical ABTS (TEAC).

Tabela 15. Coeficientes de correlação linear de *Pearson* entre as variáveis de composição e capacidade antioxidante das cultivares Brazos e Tupy. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Variáveis	Fenólicos totais	Antocianinas	Flavonoides	Ác. ascórbico
‘Brazos’				
DPPH	0,91**	0,15 ^{ns}	-0,85**	-0,30 ^{ns}
TEAC	-0,21 ^{ns}	0,97**	0,32 ^{ns}	0,86**
‘Tupy’				
DPPH	0,87**	0,66**	0,99**	0,32 ^{ns}
TEAC	0,27 ^{ns}	0,99**	0,78**	0,87**

** p<0,01; ^{ns} não significativo a p<0,05

Antocianinas totais apresentou forte correlação com atividade antioxidante ABTS para as duas cultivares, mas não com DPPH (Tabela 15), demonstrando maior contribuição de antocianinas no sequestro do radical ABTS. Esses dados concordam com Castrejón et al. (2008) que em estudos com mirtilos em diferentes estádios de maturação avaliados pelo método ABTS encontram coeficiente de correlação significativo de 0,97 entre antocianinas e atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS. Elevada correlação significativa entre atividade antioxidante DPPH e flavonoides totais foi verificada para ambas as cultivares de amoras, porém ‘Brazos’ apresentou coeficiente negativo de -0,85, sugerindo que acréscimos no conteúdo de flavonoides totais tenham influenciado diminuições na atividade antioxidante DPPH dessa cultivar. Entretanto, deve-se considerar que flavonoides são considerados bons antioxidantes, devido à substituição de grupos hidroxilas livres na estrutura dos flavonoides (ROESCH et al., 2003).

Ocorreram correlações lineares significativas da atividade antioxidante ABTS com ácido ascórbico, com coeficientes de 0,86 e 0,87, respectivamente para ‘Brazos’ e ‘Tupy’ (Tabela 15), mas não houve correlação desta variável com DPPH. A contribuição de certos grupos de compostos fenólicos para a atividade antioxidante pode variar e dependendo do método utilizado alguns antioxidantes mostram-se mais evidentes que outros.

Ferreira et al. (2007) em estudos com morango ‘Selva’ em diferentes estádios de maturação também observaram que a atividade antioxidante DPPH apresentou correlação linear significativa com os teores de fenólicos totais, não apresentando correlação significativa com o teor de antocianinas.

5.2.3 Características químicas

Acréscimos no conteúdo de ácido ascórbico durante o curso da maturação foram verificados em ambas as cultivares (Tabela 16), cujas variações foram de $38,64 \pm 3,81$ a $134,85 \pm 1,75$ mg 100 g^{-1} para ‘Brazos’ e de $53,03 \pm 3,91$ a $96,21 \pm 1,51$ mg 100 g^{-1} para ‘Tupy’. A variação no conteúdo de ácido ascórbico durante a maturação de frutos é resultado da expressão genética da espécie e não há relação com sua origem climática ou padrão respiratório (LEE; KADER, 2000; OSUNA-GARCÍA et al., 1998).

Tabela 16. Conteúdo de ácido ascórbico dos frutos de duas cultivares de amora-preta em três estádios de maturação. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Estádio de maturação dos frutos	Ácido ascórbico mg 100 g^{-1}	
	‘Brazos’	‘Tupy’
Imaturos	$38,64 \pm 3,81^c$	$53,03 \pm 3,91^c$
Intermediários	$87,12 \pm 3,81^b$	$69,70 \pm 5,53^b$
Maduros	$134,85 \pm 1,75^a$	$96,21 \pm 1,51^a$

Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem a $p < 0,05$ pelo teste Tukey. Médias \pm desvio padrão (n=5)

Ambas as cultivares apresentaram maiores teores de sólidos solúveis no estágio maduro (Tabela 17), seguido dos frutos intermediários e imaturos. Como esperado, os frutos imaturos apresentaram a maior acidez titulável. O melhor equilíbrio entre sólidos solúveis e a acidez total foi encontrado no estágio maduro de ambas as cultivares. Elevada relação sólidos solúveis/acidez titulável indica melhor sabor (SILVA; GIORDANO, 2000).

Tabela 17. Caracterização química dos frutos de duas cultivares de amora-preta em três estádios de maturação. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Estádio de maturação	Sólidos solúveis °Brix		Acidez titulável g EAC 100 g^{-1}		Sólidos solúveis / acidez titulável	
	‘Brazos’	‘Tupy’	‘Brazos’	‘Tupy’	‘Brazos’	‘Tupy’
Imaturos	$2,20 \pm 0,05^c$	$4,22 \pm 0,11^c$	$2,34 \pm 0,04^a$	$1,77 \pm 0,03^a$	$0,94 \pm 0,02^c$	$2,39 \pm 0,04^c$
Intermed.	$3,62 \pm 0,04^b$	$5,02 \pm 0,06^b$	$1,95 \pm 0,03^b$	$1,58 \pm 0,01^b$	$1,86 \pm 0,04^b$	$3,16 \pm 0,04^b$
Maduros	$7,57 \pm 0,08^a$	$9,75 \pm 0,04^a$	$1,32 \pm 0,03^c$	$1,05 \pm 0,01^c$	$5,74 \pm 0,08^a$	$9,29 \pm 0,04^a$

Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem a $p < 0,05$ pelo teste Tukey. Médias \pm desvio padrão (n=5)

EAC: equivalente ácido cítrico

5.2.4 Conclusões

Amoras-pretas ‘Brazos’ e ‘Tupy’ apresentaram conteúdos de compostos fenólicos totais mais elevados no estágio imaturo. Não houve relação entre variação de flavonoides totais e maturação dos frutos. A atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS foi maior em frutos maduros de ambas as cultivares estudadas. A atividade antioxidante DPPH foi maior em ‘Brazos’ quando imaturos. Ácido ascórbico aumentou com a maturação dos frutos de ‘Brazos’ e ‘Tupy’. Foram verificadas correlações significativas entre atividade antioxidante DPPH e conteúdo de compostos fenólicos totais para as duas cultivares. Antocianinas apresentou forte correlação com atividade antioxidante ABTS para as duas cultivares, mas não apresentou correlação com DPPH.

5.3 Capítulo 3: Composição Fenólica, Capacidade Antioxidante e Atividade de Fenilalanina Amônia-liase e Peroxidase de Amora-preta ‘Tupy’ Armazenada em Diferentes Embalagens

5.3.1 Compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides

Os teores de compostos fenólicos aumentaram significativamente com o armazenamento em ambas as embalagens utilizadas (Tabela 18). A embalagem do tipo PVC proporcionou maiores teores de compostos fenólicos dos frutos de amoreira-preta. Para ambas as embalagens, os níveis de compostos fenólicos aumentaram significativamente ao final do armazenamento. Zheng et al. (2003) também relataram aumento no teor de compostos fenólicos em mirtilos armazenados por 7 dias a 5 °C e em atmosfera controlada com diferentes concentrações de O₂.

Tabela 18. Compostos fenólicos da amora-preta ‘Tupy’ durante armazenamento nas embalagens filme de PVC e PET. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Armazenamento	Compostos fenólicos totais mg EAG g ⁻¹ (p.f.)	
	PVC	PET
1° dia	12,24 ± 0,06 ^{aB}	10,25 ± 0,01 ^{bB}
4° dias	12,03 ± 0,04 ^{aC}	10,16 ± 0,01 ^{bB}
8° dias	13,38 ± 0,27 ^{aA}	12,42 ± 0,06 ^{bA}

Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem a $p < 0,05$ pelo teste Tukey. Médias ± desvio padrão (n=5)

EAG: equivalente ácido gálico

p.f.: Peso fresco

As variações que ocorrem no teor de compostos de origem fenólica após a colheita já foram relatadas para diversos frutos, podendo haver aumento, diminuição e também comportamentos irregulares (AYALA-ZAVALA et al., 2004; RAPISARDA et al., 2008). O acréscimo no teor de compostos fenólicos na pós-colheita muitas vezes pode ser relacionado a estresses bióticos e abióticos, que induzem o metabolismo secundário do fruto, com aumento na produção desses compostos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Estresses fisiológicos pós-colheita relacionados, por exemplo, a temperatura, transpiração, oxigênio e patógenos levam a respostas fisiológicas de frutos governadas pela expressão genética do órgão, influenciando a síntese de compostos fenólicos (ROUSSOS et al., 2007). Por outro lado, Kobardz et al. (1999)

relatarem que estresses oxidativos, como desenvolvimento de patógenos e senescência podem contribuir com a redução de compostos fenólicos, através de reações oxidativas relacionadas, entre outras, ao escurecimento enzimático.

Os teores de antocianinas também foram superiores no 8º dia de armazenamento para as duas embalagens (Tabela 19). Entretanto, maiores teores de antocianinas foram verificados nos frutos embalados em PET no 8 dia de armazenamento (8,06 ECia-3-glu g⁻¹ p.f., respectivamente), enquanto frutos embalados em PVC apresentaram teores de 6,96 e 7,83 ECia-3-glu g⁻¹ p.f., respectivamente. Kalt et al. (1999) avaliaram frutos vermelhos refrigerados e também verificaram aumentos de antocianinas durante o armazenamento. Holcroft; Kader (1999), em trabalhos com armazenamento de morangos, verificaram que mesmo após a colheita a rota de biossíntese de antocianinas continua ativa.

Tabela 19. Antocianinas totais e flavonoides da amora-preta ‘Tupy’ durante armazenamento nas embalagens filme de PVC e PET. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Armazenamento	Antocianinas totais		Flavonoides totais	
	mg ECia-3-glu g ⁻¹ (p.f.)		mg EQ 100 g ⁻¹ (p.f.)	
	PVC	PET	PVC	PET
1º dia	6,97 ± 0,06 ^{aB}	6,58 ± 0,15 ^{bC}	112,13 ± 0,86 ^{aA}	90,92 ± 0,82 ^{bC}
4º dia	6,96 ± 0,05 ^{bB}	7,39 ± 0,10 ^{aB}	97,13 ± 0,71 ^{bB}	102,84 ± 0,75 ^{aB}
8º dia	7,83 ± 0,10 ^{bA}	8,06 ± 0,08 ^{aA}	98,92 ± 2,00 ^{bB}	128,52 ± 0,57 ^{aA}

Médias seguidas pela mesma letra em maiúsculo na linha e minúsculo na coluna não diferem a $p < 0,05$ pelo teste Tukey. Médias ± desvio padrão (n=5)

ECia-3-glu: equivalente Cianidina-3-glucosídeo

EQ: equivalente quercetina

P.f.: peso fresco

Segundo a Tabela 19, acréscimos nos teores de flavonoides durante o armazenamento foram observados em frutos mantidos em embalagem PET, com variações de 90,92 a 128,52 mg EQ 100 g⁻¹ (p.f.). Entretanto, para frutos embalados em PVC houve diminuições significativas, cujas variações foram de 112,13 a 98,93 mg EQ 100 g⁻¹ (p.f.). Aumentos no conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais durante o armazenamento podem ocorrer devido a liberação dos complexos dos compostos fenólicos com outros componentes como proteínas e carboidratos (DOSHI; ADSULE, 2008). Samec; Piljac-Zegarac (2011) observaram aumento nos teores de flavonoides até o 2º dia de armazenamento de frutos de amoreira-preta silvestre a 4 °C, seguido por redução até o 4º dia, e novamente aumento até o 9º dia.

5.3.2 Capacidade antioxidante

Ao final do armazenamento, a atividade antioxidante DPPH e ABTS (TEAC) dos frutos embalados com PET foi superior aos frutos com PVC (Figura 31). Entre o 1º e o 8º dia de armazenamento, frutos embalados em PVC apresentaram redução significativa da atividade antioxidante ABTS e DPPH, enquanto na embalagem PET, houve aumentos significativos.

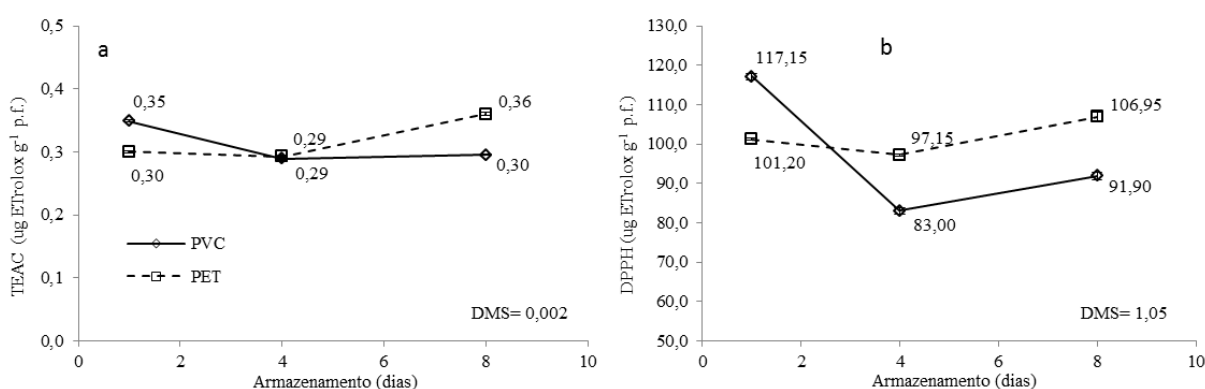


Figura 31. Atividade antioxidante da amora-preta ‘Tupy’ durante armazenamento nas embalagens filme de PVC e PET. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

DMS: diferença mínima significativa a $p < 0,05$. (n=4)

ET: Equivalente trolox

P.f.: Peso fresco

Pérez et al. (1996) verificaram redução da atividade antioxidante avaliada pelo método espectrofotométrico (Fellman et al., 1991) de morangos embalados em filme de polipropileno (PP) e armazenados por 9 dias a 1 °C. Samec; Piljac-Zegarac (2011) verificaram redução na atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS em amoras até o 8º dia de armazenamento refrigerado, sem a utilização de embalagens. Isso demonstra que a utilização da embalagem do tipo PET associada ao armazenamento refrigerado foi importante para a elevação da atividade antioxidante dos frutos. De acordo com López-Aranda et al. (1995), elevada atividade antioxidante pode resultar em maior produção de ésteres, originando frutos com aroma reforçado. Foram verificadas fortes correlações significativas (0,91) entre a atividade antioxidante DPPH e compostos fenólicos totais de frutos embalados em PET (Tabela 20), sugerindo que 91% das variações na atividade antioxidante DPPH são explicadas pelo conteúdo de compostos fenólicos dos frutos.

Tabela 20. Coeficientes de correlação linear de *Pearson* entre as variáveis de composição fenólica, atividade enzimática e capacidade antioxidante das duas embalagens PVC e PET. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Variáveis	Fenólicos totais	Antocianinas	Flavonoides	Ác. ascórbico
‘PVC’				
DPPH	-0,12 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	0,97 ^{**}	-0,75 ^{**}
TEAC	-0,28 ^{ns}	-0,41 ^{ns}	0,99 ^{**}	-0,81 ^{**}
POD	0,62 [*]	0,74 ^{**}	-0,88 ^{**}	0,86 ^{**}
FAL	0,16 ^{ns}	0,25 ^{ns}	-0,92 ^{**}	0,70 ^{**}
‘PET’				
DPPH	0,91 ^{**}	0,52 [*]	0,73 ^{**}	-0,89 ^{**}
TEAC	0,99 ^{**}	0,76 ^{**}	0,91 ^{**}	-0,80 ^{**}
POD	0,47 ^{ns}	0,88 ^{**}	0,74 ^{**}	0,05 ^{ns}
FAL	-0,47 ^{ns}	0,12 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	0,78 ^{**}

** p<0,01; ^{ns} não significativo a p<0,05

5.3.3 Atividade de peroxidase (POD) e fenilalanina amônia-liase (FAL)

Na Tabela 21 são apresentados os valores da atividade de POD e FAL.

Tabela 21. Atividade de peroxidase e fenilalanina amônia liase de frutos da amora-preta ‘Tupy’ durante armazenamento nas embalagens plásticas PVC e PET. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

Armaze- namento	Peroxidase Δ abs. min ⁻¹ g ⁻¹ (p.f.)		Fenilalanina amônia-liase mg de ácido <i>trans</i> -cinâmico h ⁻¹ mg ⁻¹ (p.f.)	
	PVC	PET	PVC	PET
1° dia	0,18 ± 0,03 ^{aA}	0,10 ± 0,01 ^{bC}	0,11 ± 0,52 ^{bB}	0,19 ± 2,45 ^{aB}
4° dias	0,18 ± 0,07 ^{bA}	0,38 ± 0,07 ^{aA}	0,21 ± 2,29 ^{bA}	0,83 ± 4,98 ^{aA}
8° dias	0,20 ± 0,09 ^{bA}	0,32 ± 0,10 ^{aB}	0,19 ± 1,82 ^{bA}	0,24 ± 6,19 ^{aB}

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem a p<0,05 pelo teste Tukey. Médias ± desvio padrão (n=4)

P.f.: peso fresco

A atividade da enzima peroxidase foi modificada durante o armazenamento para frutos armazenados em embalagem PET, sendo significativamente superior aos 4 dias de armazenamento. O armazenamento não influenciou significativamente na atividade de peroxidase para frutos armazenados em embalagem PVC. No primeiro dia do armazenamento, a atividade de peroxidase dos frutos embalados em PVC foi superior comparado à embalagem PET, mas foi inferior ao final do armazenamento.

Del Aguila et al. (2009) em estudos com lichias ‘Bengal’ armazenadas em diferentes embalagens e mantidas a 5 °C, encontraram atividade de POD superior quando os frutos foram mantidos em embalagem do tipo PET e inferior em embalagens tipo PVC (14 µm). A enzima POD catalisa reações redox em vegetais, usando tanto o peróxido de hidrogênio, como o oxigênio e outros aceptores de hidrogênio. O mecanismo de ação das enzimas POD é baseado na formação de complexos entre enzima e doador de hidrogênio. São encontradas no citoplasma (forma solúvel), na parede celular (forma insolúvel), membranas e organelas das células vegetais. Atua na catálise de reações oxidativas, peroxidativas e de hidroxilação. Atuam oxidando diferentes doadores de hidrogênio, tais como fenólicos, aminas, leucobases e compostos heterocíclicos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

A atividade da enzima FAL foi significativamente maior nos frutos embalados em PET para todos os períodos de armazenamento (Tabela 21). Em frutos embalados em PVC, maior atividade de FAL ocorreram no 4° e 8° dias de armazenamento, sendo os valores estatisticamente iguais nesses dois períodos. Na embalagem PET, os frutos apresentaram aumento significativo de FAL do 1° para o 4° dia de armazenamento, seguido de diminuição no 8° dia.

Condições de estresse fisiológico em tecidos vegetais desencadeiam a transcrição do RNA mensageiro que codifica a FAL, aumentando sua quantidade na planta e estimula a síntese de compostos fenólicos (CIVELLO et al., 1997). O aumento da atividade de FAL é indicativo de condições de estresse nos tecidos vegetais, pela ação de agentes bióticos ou abióticos, sendo que os frutos encontram-se em constante estresse desde o momento da colheita e nas posteriores etapas de pós-colheita (TAIZ; ZEIGER, 2009). Dessa forma, a embalagem PET provocou maior estresse fisiológico nos frutos, quando comparado à embalagem de PVC.

5.3.4 Características físico-químicas

Perda de massa fresca, sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT), relação SS/AT, pH e ácido ascórbico são apresentados na Figura 32. Independente da embalagem utilizada houve perdas significativas de massa fresca durante o armazenamento dos frutos. A embalagem PET contribuiu com menor perda de massa fresca dos frutos, comparado a embalagem de PVC, sendo verificadas perdas de 0,92 e 2,49%, respectivamente para PET e PVC, aos 4 dias de armazenamento, e de 4,86 e 5,25%, respectivamente para PET e PVC, aos

8 dias de armazenamento. Esses resultados sugerem que a embalagem PET apresenta maior barreira ao vapor de água do que a embalagem PVC.

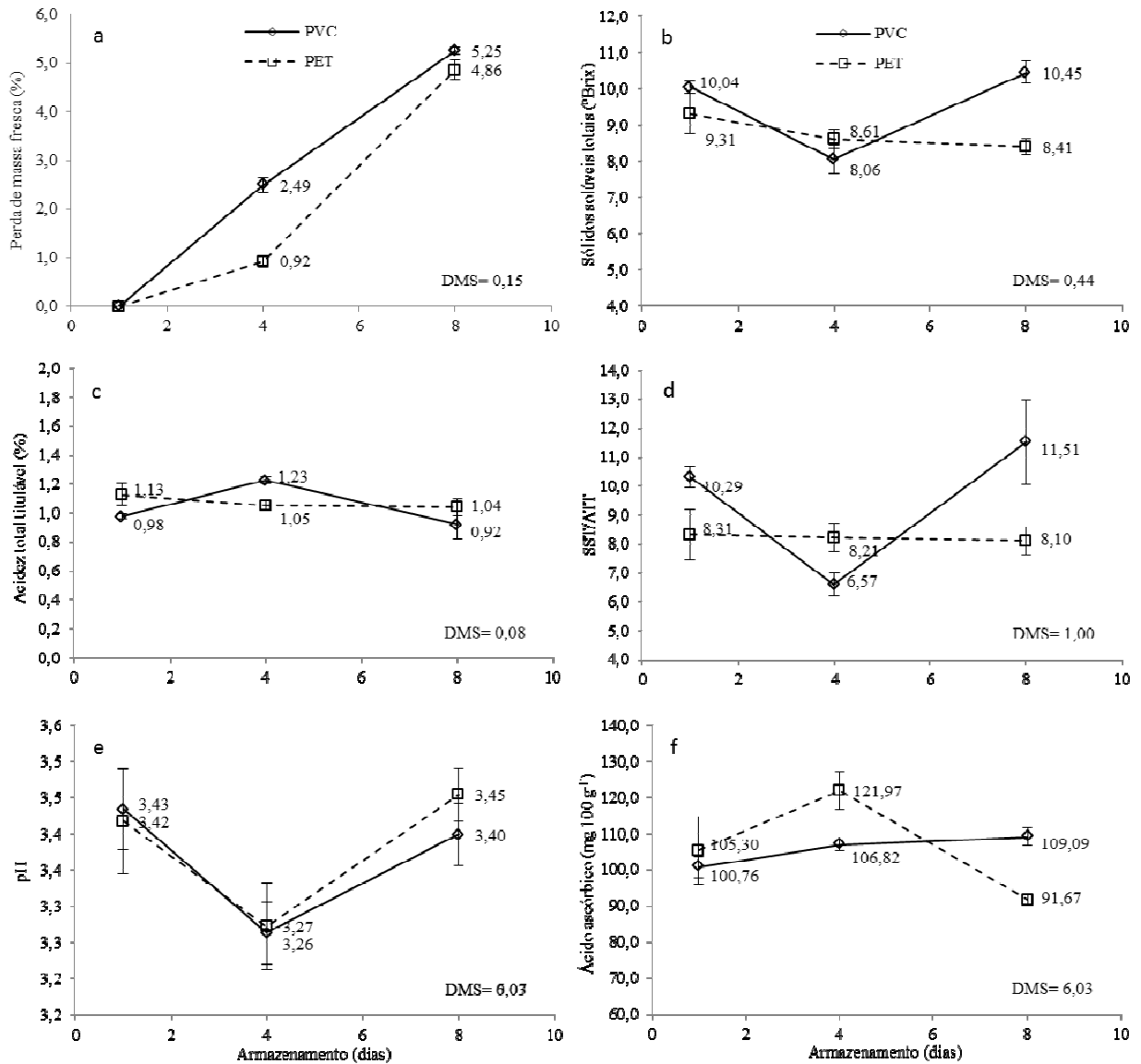


Figura 32. Características físico-químicas da amora-preta ‘Tupy’ durante armazenamento nas embalagens plásticas de PVC e PET. Marechal Cândido Rondon-PR, 2012.

DMS: diferença mínima significativa a $p < 0,05$. (n=4)
SS/AT: relação sólidos solúveis/acidez titulável

Perdas de massa fresca em frutos ocorrem em decorrência da água eliminada por transpiração, e sofre influência dos processos metabólicos de respiração e da diferença de pressão de vapor entre o fruto e o ar ambiente (SOUZA et al., 2000). Em sistemas de embalagens fechadas, a perda de umidade do produto fresco é determinada principalmente

pela permeabilidade do material ao vapor de água (JOO et al., 2011). A maior perda de massa fresca dos frutos mantidos em embalagem PVC sugere maior permeabilidade do material ao vapor de água, influenciando o maior diferencial de pressão de vapor de água entre o fruto e a atmosfera interna da embalagem.

Para ambas as embalagens utilizadas neste experimento, a perda de massa foi inferior à reportada por Antunes et al., (2003) que trabalhando com frutos de amoreira-preta 'Comanche' armazenadas em ambiente refrigerado (2° C) embalados em bandejas de polietileno revestidas com PVC, observaram perda de massa de 5,90% aos 8 dias de armazenamento. Perkins-Veazie; Collins (1996) relataram que a perda de massa de frutos maduros de amora-preta das cultivares Choctaw, Navaho, Shawnee e Cheyenne variou de 1,7 a 2,6 % após 7 dias de armazenamento somente sob armazenamento refrigerado, a 2° C.

Frutos mantidos na embalagem PET apresentaram redução do teor de sólidos solúveis entre o 1° e o 8° dia de armazenamento (9,31 e 8,41 °Brix, respectivamente), mas sem diferenças significativas entre o 4° e 8° dias (8,61 e 8,41° Brix, respectivamente) (Figura 32). No entanto, frutos mantidos em embalagem PVC apresentaram redução significativa entre 1 e 4 dias de armazenamento (10,04 e 8,06 °Brix, respectivamente), seguido de aumento aos 8 dias (10,45 °Brix). Explicações relatadas na literatura para variações em sólidos solúveis em frutos armazenados sugerem que reduções podem ocorrer em decorrência de perda de massa fresca durante o armazenamento, ou também devido à utilização de substâncias solúveis (açúcares e ácidos orgânicos) como substratos do metabolismo respiratório (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Até 4 dias de armazenamento, relação direta entre perda de massa fresca e diminuição de sólidos solúveis ocorreu, ou seja, frutos embalados em PVC apresentaram maior perda de massa e maior diminuição de sólidos solúveis dos frutos, comparativamente aos frutos embalados em PET.

Segundo Jeronimo; Kanesiro (2000), o aumento no teor de sólidos solúveis pode ocorrer devido à conversão das reservas acumuladas em açúcares solúveis. Perkins-Veazie; Collins (1996) verificaram aumento de sólidos solúveis nas cultivares de amora-preta Choctaw, Cheyenne, Navaho e Shawnee depois de sete dias de estocagem a 2°C, e relacionaram esse aumento à perda de massa fresca, concentrando os sólidos solúveis, e também à hidrólise de outros materiais da parede celular. Scalon et al. (1996) obtiveram resultados similares com morango após 14 dias armazenado em refrigeração.

Com relação à acidez titulável (% equivalente ácido cítrico), não foram verificadas diferenças significativas durante o armazenamento, notadamente, no intervalo entre o primeiro e o oitavo dia para ambas as embalagens plásticas, que variou de 0,98 a 0,92%

(respectivamente) para a embalagem PVC, e de 1,13 a 1,04 (respectivamente) para a embalagem PET (Figura 32). A manutenção da acidez do fruto é muito importante porque garante sabor e odor característicos ao produto (CHITARRA; CHITARRA, 2005). A perda de acidez está relacionada ao processo natural de maturação dos frutos, pois ocorre a utilização de ácidos orgânicos, principalmente cítrico, como substrato no processo respiratório via ciclo de Krebs (MAZARO et al., 2008). Vieites et al. (2006) relataram que ao longo do armazenamento de frutos a acidez titulável tende a diminuir. Meneghel et al. (2008) em estudos com amora-preta 'Comanche' revestidas com alginato de sódio e armazenadas sob refrigeração, produzidas em Londrina, PR, não encontraram diferenças estatísticas de acidez titulável ao longo de 18 dias de armazenamento (0 °C).

Maior relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT) foi verificado em frutos armazenados na embalagem de PVC após 8 dias de armazenamento (Figura 32). Nos frutos armazenados em embalagem PET, SS/AT foi estatisticamente semelhante ao longo do armazenamento. Essa relação indica equilíbrio entre os açúcares e a acidez de frutos, como as amoras, e reflete, numericamente, o sabor do produto (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Com relação ao pH dos frutos, diferenças significativas foram verificadas entre as embalagens apenas no 8º dia de armazenamento (3,40 e 3,45, respectivamente para PVC e PET) (Figura 32). Entretanto, diminuições significativas foram verificadas até o 4º dia para os frutos de ambas as embalagens, seguido de aumentos significativos no 8º dia. Resultados semelhantes foram obtidos por Antunes et al. (2003) com amoras 'Comanche' e 'Brazos' armazenadas em embalagem PET transparente envolta com filme de PVC e mantidas sob refrigeração (2° C), mas não apresentaram diferença estatística de pH durante todo o período de armazenamento. Scalon et al. (1996), trabalhando com morango 'Sequóia', em ambiente refrigerado e atmosfera modificada, também não observaram alterações significativas de pH depois de 14 dias de armazenamento.

O teor de ácido ascórbico dos frutos embalados em PVC apresentou aumento significativo entre o início e o final do armazenamento (100,76 e 109,09 mg 100 g⁻¹, respectivamente), No entanto, a utilização da embalagem PET proporcionou aumento significativo no teor de ácido ascórbico do 1º (105,30 mg 100 g⁻¹) para o 4º dia (121,97 mg 100 g⁻¹) de armazenamento, seguida de redução significativa do 4º (121,97 mg 100 g⁻¹) para o 8º dia (91,67 mg 100 g⁻¹) (Figura 32). Tais resultados sugerem maior retenção de ácido ascórbico com o uso da embalagem PVC. Chitarra; Chitarra (2005) relataram que perdas substanciais de nutrientes ocorrem durante o armazenamento, especialmente de ácido ascórbico, devido à sua elevada instabilidade química. De acordo com

Stevens et al. (2008), a manutenção dos níveis de ácido ascórbico em órgãos vegetais é rigidamente controlada por níveis de síntese, degradação, reciclagem e transporte dentro da célula. O autor cita também que devido ao papel antioxidante do ácido ascórbico, esta via de reciclagem no fruto é especialmente importante durante a resposta do órgão a estresses oxidativos, quando o ácido ascórbico reduzido é oxidado para sua forma instável de deidroascorbato, que pode ser facilmente degradado. De acordo com Smirnoff; Wheeler (2000), a forma reduzida do ácido ascórbico pode ser esgotada se as formas oxidadas não forem recuperadas por enzimas redutases (monodeidroascorbato e deidroascorbato redutase), expressas geneticamente em resposta a estresses oxidativos.

Correlações negativas entre ácido ascórbico e as atividades antioxidantes DPPH e ABTS foram verificadas para frutos embalados em PVC (-0,75 e -0,81, respectivamente) e em PET (-0,89 e -0,80, respectivamente) (Tabela 20), indicando que o ácido ascórbico não contribui para a atividade antioxidante dos frutos de amoreira-preta. Segundo Heim (2002), os maiores responsáveis pela atividade antioxidante em frutos são os compostos fenólicos. Sun et al. (2002) demonstraram que a contribuição da vitamina C na atividade antioxidante de frutos é baixa, e afirmaram que tal atividade se deve aos compostos fitoquímicos, principalmente aos pigmentos antociânicos.

5.3.5 Degradação pós-colheita

A podridão pós-colheita é responsável por significativo percentual de perdas (AHMADI et al., 1999). O controle do enrugamento é de fundamental importância, visto que amora, geralmente, é comercializado por quilo e pelo fato de o consumidor comprar os frutos pela aparência. A desidratação do fruto, que leva ao enrugamento, ocorre pelo processo de transpiração, o qual é influenciado por vários fatores, tais como: espessura da casca, presença e número de estômatos, temperatura, umidade relativa do ambiente de armazenamento e presença de barreiras artificiais (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Os dados observados (Figura 33) refletem o nível de degradação dos frutos de acordo com o nível de enrugamento. Os frutos começaram a apresentar enrugamento a partir do 3º dia do armazenamento, somente para frutos armazenados em PVC. Frutos armazenados em PVC apresentaram maior degradação pós-colheita ao final do período de armazenamento, provavelmente devido à permeabilidade da embalagem de PVC ser maior à PET.

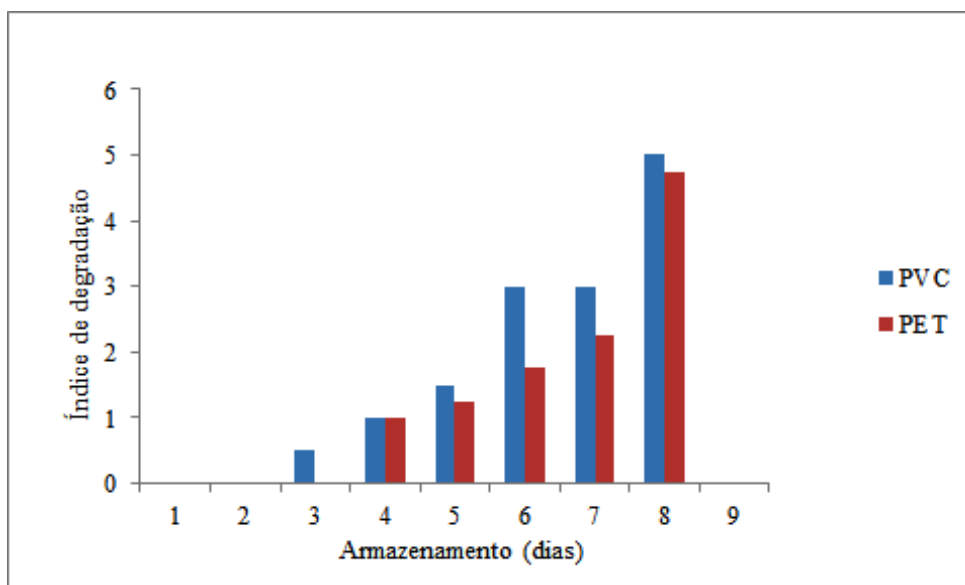


Figura 33. Degradação de frutos de amoreira-preta ‘Tupy’ durante armazenamento nas embalagens plásticas de PVC e PET

Fonte: CELANT, V. M., Unioeste, Campus Marechal Cândido Rondon. 2012.

O uso da embalagem está diretamente relacionada à taxa de permeabilidade ao vapor d’água do filme, quanto menor a taxa de transmissão, menor será o déficit de pressão de vapor e maior a umidade relativa no interior da embalagem, reduzindo, conseqüentemente, a transpiração dos frutos. Desta forma, a embalagem PET proporcionou uma menor perda de massa dos frutos, e também manteve os frutos com melhor aparência, resultando em maior vida útil dos frutos. Segundo Kays (1997), quando as perdas de umidade, especialmente em frutos pequenos, atingem valores superiores a 5%, podem surgir sintomas de enrugamento, os quais, mesmo não alterando a qualidade interna, prejudicam sua aparência, tornando-os inaceitáveis ao consumidor.

5.3.6 Fungos identificados

Os fungos do gênero *Penicillium* e *Fusarium* foram identificados em alguns nos frutos por análise microscópica. Cia et al. (2007) em estudos com amoras ‘Guarani’ armazenadas pelo período de 9 dias a 5 °C com e sem embalagem de PEBD (filme de polietileno linear de baixa densidade de 25 µm) envolvendo bandejas de poliestireno verificaram que a utilização da embalagem acarretou em aumento da incidência de podridões

nos frutos devido à maior umidade proporcionada pela embalagem, sendo *Botrytis cinerea* o fungo de maior incidência.

5.3.7 Conclusões

Maior perda de massa ocorreu em amoras embaladas em PVC. Frutos armazenados em PVC apresentaram maior relação SST/ATT e a embalagem de PVC proporcionou maior retenção de ácido ascórbico nas amoras. A atividade antioxidante DPPH e ABTS dos frutos embalados com PET foi superior aos frutos com PVC. A embalagem PET influenciou aumentos da atividade antioxidante da amora-preta durante o armazenamento. Os teores de compostos fenólicos aumentaram com o armazenamento em ambas as embalagens utilizadas. Os teores de antocianinas também foram superiores no 8º dia do armazenamento, principalmente em frutos mantidos em embalagem do tipo PET. Correlação significativa entre atividade antioxidante DPPH e compostos fenólicos totais ocorreu apenas em frutos embalados em PET. A atividade da enzima peroxidase foi maior no 4º dia de armazenamento para ambas as embalagens, e a atividade de FAL foi maior nos frutos embalados em PVC.

6 CONCLUSÕES GERAIS

‘Arapaho’ apresentou a maior capacidade antioxidante, indicando que é o material genético com maior atividade biológica entre as cultivares testadas no presente trabalho. Os frutos de amoreira-preta das cultivares analisadas neste experimento apresentam teores de compostos fenólicos, antocianinas totais e flavonoides bastante superiores às mesmas cultivares produzidas em outros locais, como Sul de Minas Gerais, Mar Negro da Turquia e Norte da Grécia.

Os dados revelam que a cultivar ‘Tupy’ é a cultivar mais saborosa, devido à sua alta relação entre sólidos solúveis e acidez titulável, ao contrário de ‘Guarani’ e ‘Choctaw’, que possuem sabor mais ácido. A cultivar ‘Tupy’ apresentou-se como ótima opção de pequena fruta para ser cultivada na região Oeste do Paraná, em vista da sua alta produtividade, razão pela qual foi utilizada nos 3 experimentos deste trabalho, e também devido ao seu sabor extremamente agradável, ótima tanto para o consumo *in natura* como para produção de sucos, geleias e demais produtos processados. A embalagem plástica do tipo PET é ideal para conservação dos frutos de amoreira-preta, pois devido à sua menor permeabilidade ao vapor d’água (quando compara à embalagem PVC), reduz a transpiração dos frutos, mantendo os frutos com melhor aparência e reduzindo os danos com o enrugamento.

Dos métodos de avaliação da atividade antioxidante utilizados no presente trabalho, o que apresentou melhores resultados foi o método do DPPH, sendo melhor correlacionado com fenólicos totais, antocianinas e flavonoides. Maior atividade antioxidante DPPH foi verificada em frutos imaturos de ‘Brazos’. Ácido ascórbico aumentou com a maturação dos frutos de ‘Brazos’ e ‘Tupy’.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, H. M.; SALAMA, M. M.; ABD-ELRAHMAN, E. H.; EL-MARAGHY, S. A. Antidiabetic activity of phenolic compounds from Pecan bark in streptozotocin-induced diabetic rats. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 337-341, 2011.
- ABREU, C. M. P.; CARVALHO, V. D.; GONÇALVES, N. B. Cuidados pós-colheita e qualidade do abacaxi para exportação. **Informe Agropecuário**, v. 19, n. 195, p. 70-72, 1998.
- ACOSTA-MONTOYA, O.; VAILLANT, F.; COZZANO, S.; MERTZ, C.; PEREZ, A. M.; CASTRO, M. V. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1497-1501, 2010.
- ALMENAR, E.; SAMSUDIN, H.; AURAS, R.; HARTE, B.; RUBINO, M. Postharvest shelf life extension of blueberries using a biodegradable package. **Food Chemistry**, v. 110, p. 120-127, 2008.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceeding of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 90, p. 7915-7922, 1993.
- ANGELO, P. M.; JORGE, J. **Compostos fenólicos em alimentos** - Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. C. B. **Aspectos técnicos da cultura da amora-preta**. Pelotas-RS: Embrapa Clima Temperado, 2004, 54 p.
- ANTUNES, L. E. C.; DUARTE-FILHO, J.; SOUZA, C. M. Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 413-419, 2003.
- ANTUNES, L. E. C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 151-158, 2002.
- ANTUNES, L. E. C.; CHALFUN, N. N. J.; REGINA, M. A.; DUARTE FILHO, J. Fenologia e produção de variedades de amora-preta nas condições do planalto de Poços de Caldas-MG. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 1, p. 89-95, 2000.
- ANTUNES, L. E. C. **Aspectos fenológicos, propagação e conservação pós-colheita de frutas de amoreira-preta (*Rubus spp.*) no sul de Minas Gerais**. 1999. 129 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. v. 2, 16^a ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemist, 1995.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos**. Teoria e Prática. 3^a Edição. Viçosa: UFV, 2004, 478 p.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, n. 2, p. 235-241, 1992.

ATKINSON, C. J., NESTBY, R., FORD, Y. Y., DODDS, P. A. A. Enhancing beneficial antioxidants in fruits: A plant physiological perspective. **Biofactors**, v. 23, p. 229-234, 2005.

AYALA-ZAVALA, J. F.; WANG, S. Y.; WANG, C. Y.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, p. 687-695, 2004.

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.

BARCIA, M. T., JACQUES, A. C., PERTUZATTI, P. B., ZAMBIAZI, R. C. Determination by HPLC of ascorbic acid and tocopherols in fruits. **Semina**, v. 31, p. 381-390, 2010.

BARROS, L.; DUEÑAS, M.; FERREIRA I. C. F. R.; CARVALHO, A. M.; SANTOS-BUELGA C. Use of HPLC-DAD-ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. **Food Chemistry**, v. 127, p. 169-173, 2011.

BASSOLS, M. C. M.; MOORE, J. N. 'Ébano' thornless blackberry. **HortScience**, v. 16, n. 5, p. 686-687, 1981a.

BASSOLS, M. C.; MOORE, J. N. 'Ébano': primeira cultivar de amora-preta sem espinhos lançada no Brasil. Pelotas: Embrapa-Uepae de Cascata, 1981b. 16 p.

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

BAYDAR, N. G., ÖZKAN, G., SAĞDIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**, v. 15, p. 335-339, 2004.

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

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research Technology**, v. 219, p. 561-571, 2004.

BENASSI, M. T.; ANTUNES, A. J. A. Comparison of meta-phosphoric and oxalic acids as extractant solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 31, p. 507-513, 1988.

BENNET, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, v. 127, p. 617-633, 1994.

BEN-YEHOSHUA, S. **Transpiration, water stress, and gás exchange.** In: POSTHARVEST PHYSIOLOGY OF VEGETABLES. [Ed.] WEICHMANN, J., New York: Marcel Dekker, p.113-70, 1987.

BILYK, A.; SAPERS, G. M. Varietal differences in the quercetin, kaempferol, and myricetin contents of highbush blueberry, cranberry, and thornless blackberry fruits. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 585-588, 1986.

BLEIRONTH, E. W. Matéria-prima. In: FRUTOS TROPICAIS, MANGA [Ed.] MEDINA, J. C.. São Paulo: ITAL, p.243-292, 1981.

BOBBIO, P. A., BOBBIO, F. O. **Introdução à química de alimentos.** 2ª.ed. São Paulo: Varela, 1995. 222 p.

BOBBIO, P. A. BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos.** 2ª ed. São Paulo: Varela, 1992, 151p.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos.** 2ª.ed. São Paulo: Varela, 1989, 231 p.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 40, n. 6, p. 609-615, 1997.

BONIFACE, R.; MISKULIN, M.; ROBERT, L.; ROBERT, A. M. Pharmacological properties of Myrtillus anthocyanosides: correlation with results of treatment of diabetic microangiopathy. In FLAVONOIDS AND BIOFLAVONOIDS, 1ª Ed.; [Ed.] FARKAS, L., GABOR, M. KALLAY, F., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, v. 1, p. 293-301, 1985.

BOTREL, N. Manga: Variedades, Qualidade e Tecnologia Pós-Colheita. **Informe Agropecuário**, v. 17, n. 179, p. 55-60, 1994.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

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

BUSHMAN, B. S.; PHILLIPS, B.; ISBELL, T.; OU, B.; CRANE, J. M.; KNAPP, S. J. Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7982-7987, 2004.

CANTOS, E.; TUDELA, J. A.; GIL, M. I.; ESPIN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh cut potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 3015-3023, 2002.

CARVALHO, V. D. Qualidade e conservação pós-colheita de goiabas. **Informe Agropecuário**, v. 17, n. 179, p. 48-54, 1994.

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.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 2005, 650 p.

CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 178-182, 2002.

CHEN, X.; HERTOOG, M. L. A. T. M.; BANKS, N. H. The effect of temperature on gas relations in MA packages for capsicums (*Capsicum annuum* L, cv. Tasty): an integrated approach. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 71-80, 2000.

CHITARRA, A. B. **Tecnologia de pós-colheita para frutas tropicais**. Fortaleza: Instituto de Desenvolvimento da Fruticultura e Agroindústria - SINDIFRUTA, 2001, v. 150, 314 p.

CHITARRA, A. B.; PRADO, M. E. T. **Tecnologia e armazenamento pós-colheita para frutos e hortaliças in natura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002, 112 p.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005, 783 p.

CHOI, H. W.; KIM, Y. J.; LEE, S. C.; HONG, J. K.; HWANG, B. K. Hydrogen peroxide generation by pepper extracellular peroxidase CaPO₂ activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. **Plant Physiology**, v. 145, p. 890-904, 2007.

CHO, M. J.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L.; CLARK, J. R. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/ mass spectrometry. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 84, p. 1771-1782, 2004.

CHO, M. J.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L.; CLARK, J. R. Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/ mass spectrometry. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 85, p. 2149-2158, 2005.

CIA, P.; BRON, I U.; VALENTINI, S. R. T.; PIO, R.; CHAGAS, E. A. Modified atmosphere and refrigeration for the postharvest conservation of blackberry. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p. 11-16, 2007.

CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A. R.; ANON, M. C. Heat treatments delay ripening and postharvest decay of strawberry fruit. **Food Chemistry**, v. 45, p. 4589-4594, 1997.

CLARK, J. R. Blackberry: world production and perspectives. In: SIMPÓSIO, NACIONAL DO MORANGO e ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO

MERCOSUL, 3., 2. **Anais...** Pelotas, RS. p. 11-16, 2006. (Embrapa Clima Temperado, Documentos 167).

CLARK, J. R.; MOORE, J. N. Short-term fruit storage performance of Arkansas blackberry cultivars. **Arkansas Farm Research-Arkansas Agricultural Experiment Station**, v. 39, n. 9, 1990.

CONNOR, A. M.; FINN, C. E.; MCGHIE, T. K.; ALSPACH, P. A. Genetic and environmental variation in anthocyanins and their relationship to antioxidant activity in blackberry and hybridberry cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 130, p. 680-687, 2005.

CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO J. R. O.; GENOVESE, M. I.; LLAJALO, F. M. Influence of cultivation quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2581-2586, 2002.

COUTINHO, E. F.; MACHADO, N. P.; CANTILLANO, R. F. F. Conservação pós-colheita de amora-preta. In: ASPECTOS TÉCNICOS DA CULTURA DA AMORA-PRETA. [Ed.] ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M. do C. B. **Anais...** Pelotas, RS. p. 45-49, 2004 (Embrapa Clima Temperado, Documentos, 122).

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 854, p. 435-442, 1998.

DAI, L. P.; XIONG, Z. T.; YU, H.; LI, M. J. Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of *Azolla imbricata*. **Environmental Toxicology**, v. 21, n. 5, p. 505-512, 2006.

DAUBENY, H. A. Brambles. In: VINES AND SMALL FRUITS. [Ed.] JANICK J.; MOORE, J.N. Hoboken, NJ: John Wiley. p. 109-190, 1996.

DE ANCOS, B., SGROPPO, S., PLAZA, L., CANO, M. P. Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 790-796, 2002.

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

DEIGHTON, N.; BRENNAN, R.; FINN, C.; DAVIES, H. V. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 80, p. 1307-1313, 2000.

DEL AGUILA, J. S.; HOFMAN, P.; CAMPBELL, T.; MARQUES, J. R.; DEL AGUILA, L. S. H.; KLUGE R. A. Pré-resfriamento em água de lichia 'B3' mantida em armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2373-2379, 2009.

DE PASCUAL-TERESA, S.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 1679-1703, 2010.

DICKERSON, G. W.; **Blackberry Production in New Mexico**. Cooperative Extension Service College of Agriculture and Home Economics. New Mexico State University. NMSU and the U.S. Department of Agriculture cooperating. Guide H-325, 8 p., July, 2000.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DOSHI, P.J.; ADSULE, P.G. Effect of storage on physicochemical parameters, phenolic compounds and antioxidant activity of grapes. In: ISHS ACTA HORTICULTURAE 785: International Symposium on Grape Production and Processing, p. 447-452, 2008.

DUMAS, Y.; DADOMO, M.; LUCCA, G. D.; GROLIER, O.; DI LUCCA, D. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 369-382, 2003.

DUNFORD, H. B.; STILLMAN, J. S. On the function and mechanism of action of peroxidases. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 19, n. 3, p. 187-251, 1976.

DUTHIE, S. J. Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 665-674, 2007.

EL GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; CALLAHAN, A. M.; Induction of chitinase, β -1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. **Phytopathology**, v. 93, n. 3, p. 349-355, 2003.

Embalagem plástica de filme PVC (policloreto de vinila) e bandeja de EPS (poliestireno expandido). Fonte:

<http://www.demux.com.br/embalagem/filme-pvc-28-cm-x-15-m.html>, 2013. Acesso em: 25 abr. 2012.

ESPIN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural corants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1588-1592, 2000.

ESTERBAUER, H.; SCHMIDT, R.; HAYN, M. Relationships among oxidation of low-density lipoprotein, antioxidant protection, and atherosclerosis. **Advances in Pharmacology**, v. 38, p. 425-456, 1996.

FAN-CHIANG, H. J.; WROLSTAD, R. E. Sugar and nonvolatile acid composition of blackberries. **Journal of AOAC International**, v. 93, p. 956-965, 2010.

FAN-CHIANG, H. J.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanin pigment composition of blackberries. **Journal of Food Science**, v. 70, p. C198-C202, 2005.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant of Physiololy**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 23-26, 2006.

FATIBELLO - FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, p. 455-464, 2002.

FELLMAN, J. K.; MATTHEIS, J. P.; MATTHINSON, D. S.; BOSTICK, B.C. Assay of acetyl-CoA alcohol transferase in “Delicious” apples. **HortScience**, v. 27, p. 773-776, 1991.

FERNANDEZ, G.; BALLINGTON, J. R. **Growing Blackberries in North Carolina**. North Carolina State University, North Carolina A&T State University, US Department of Agriculture, and local governments cooperating, 1999, 9 p.

FISHER, P. **Raspberry varieties for Ontario**. Disponível em: <<http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/raspvarc.pdf>>. Acesso em: 24 jan. 2012.

FERREYRA, R. M.; VINA, S. Z.; MUGRIDGE, A.; CHAVES, A. R. Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva. **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 27-32, 2007.

FILGUEIRAS, H. A. C.; CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Armazenamento de ameixas sob refrigeração e atmosfera modificada - 2: colapso interno (internal breakdown) e textura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 18, n. 1, p. 129-135, 1996.

FINGER, F. L.; VIEIRA, G. **Controle da Perda Pós-colheita de Água em Produtos Minimamente Processados**. Viçosa: UFV, 1997, 29 p.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 247-254, 2003.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, p. 182.

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

FREEDMAN, J. E.; PARKER, C.; LI, L.; PERLMAN, J. A.; FREI, B.; IVANOV, V.; DEAK, L. R.; IAFRATI, M. D.; FOLTS, J. D. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. **Circulation**, v. 103, p. 2792-2798, 2001.

GARCIA-ALONSO, M.; MINIHANE, A. M.; RIMBACH, G.; RIVAS-GONZALO, J. C.; DE PASCUAL-TERESA, S. Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 521-529, 2009.

GIUSTI, M. M.; JING, P. Natural pigments of berries: functionality and application. In: BERRY FRUIT. Value-Added Products for Health Promotion, 1^a ed.; [Ed.] ZHAO, Y., Ed.; CRC: Boca Raton, FL, Vol. 1, p. 105-146, 2007.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 217-225, 2003.

GÓMEZ-RUIZ, J. A.; RAMOS, M.; RECIO, I. Identification of novel angiotensin-converting-enzyme-inhibitory peptides from ovine milk proteins by CE-MS and chromatographic techniques. **Electrophoresis**, v. 28, p. 4202-4211, 2007.

GONÇALVES, E. D.; ZAMBON, C. R.; SILVA, D. F.; SILVA, L. F. O.; PIO, R.; ALVARENGA, A. A. **Implantação, manejo e pós-colheita da amoreira-preta**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2011. 5 p.

GONZÁLEZ, E. M.; BEGONA DE ANCOS, M. Relation between bioactive compounds and free radical-scavenging capacity in berry fruits during frozen storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 722-726, 2003.

GRANDALL, P. C. **Bramble production: the management and marketing of raspberries and blackberries**, 1995, 172 p.

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; GEBHARDT, S.; PRIOR, R. L. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 613-617, 2004.

HAGER, T. J.; HOWARD, L. R.; LIYANAGE, R.; LAY, J. O.; PRIOR, R. L. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 661-669, 2008.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p. 73-82, 1982.

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

HARBORNE, J. B. **Plant chemosystematics**. Academic Press, London, UK, 1984.

HARDENBURG, R. E.; WATADA, A. E.; WANG, C. Y. **The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks**. California: USDA Agricultural Research Serial, 1986, 130 p.

HASSIMOTTO, N. M. A.; MOTA, R. V.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 702-708, 2008.

HAYOUNI, E. A.; ABEBRADDA, M.; BOUIX, M.; HAMDI, M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1126-1134, 2007.

HE, J.; GIUSTI, M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Food Science and Technology**, v. 1, p. 163-187, 2010.

HEIM, T. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure - activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572- 584, 2002.

HEINONEN, I. M.; LEHTONEN, P. J.; HOPIA, A. I. Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 25-31, 1998.

HELDT, H. W. **Plant biochemistry**. 3^a ed. California: ELSEVIER, 2005. 565p.

HENNING, W. Phenolics of fruit. XIV: Flavonol glycosides of strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.), raspberries (*Rubus idaeus* L.) and blackberries (*Rubus fruticosus* L.). **Lebensm Unters Forsch**, v. 173, p. 180-187, 1981.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; ALMENAR, E.; VALLE, V. D.; VELEZ, D.; GAVARA, R. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 110, p. 428-435, 2008.

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

HODGES, D. M. **Postharvest oxidative stress in horticultural crops**. Ney York: Food Products Press, 2003, 266p.

HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Controlled atmosphere induced changes in pH and organic acid metabolism may affect color of stored strawberry fruit. **Postharvest biology and Technology**, v. 17, n. 14, p. 19-32, 1999.

HOWARD, L. R.; HAGER, T. J. Berry fruit phytochemicals. In BERRY FRUIT VALUE-ADDED PRODUCTS FOR HEALTH PROMOTION, 1^a ed.; [Ed.] ZHAO, CRC Press: Boca Raton, FLORIDA, v. 1, p. 73-104, 2007.

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

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821-1835, 2011.

JENSEN, G. S.; WU, X.; PATTERSON, K. M.; BARNES, J.; CARTER, S. G.; SCHERWITZ, L.; BEAMAN, R.; ENDRES, J. R.; SCHAUSS, A. G. In vitro and in vivo antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8326-8333, 2008.

JERÔNIMO, E. M.; KANESIRO, M. A. B. Efeito da associação de armazenamento sob refrigeração e atmosfera modificada na qualidade de mangas “Palmer”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 2, p. 237-243, 2000.

JIAO, H.; WANG, S. Y. Correlation of antioxidant capacities to oxygen radical scavenging enzyme activities in blackberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5672-5676, 2000.

JOO, M.; LEWANDOWSKI, N.; AURAS, R.; HARTE, J.; ALMENAR, E. Comparative shelf life study of blackberry fruit in bio-based and petroleum-based containers under retail storage conditions. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1734-1740, 2011.

JU, Z. Y., HOWARD, L. R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5207-5213, 2003.

KADER, A. A. Postharvest biology and technology: an overview. In: **POSTHARVEST TECHNOLOGY OF HORTICULTURAL CROPS**. [Ed.] KADER, A.A. Oakland: University of California, p. 15-20, 1992.

KADER, A. K.; SEUNG, K. L. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 207-220, 2000.

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

KALT, W.; LAWAND, C.; RYAN, D.; McDONALD, J. E.; DONNER, H. Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), during ripening and storage. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, p. 917-923, 2003.

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 Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4638-4644, 1999.

KAUME, L., HOWARD, L. R., DEVAREDDY, L. The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5716-5727, 2012.

KAUME, L.; GADANG, V.; GILBERT, W.; WANG, L.; SMITH, B. J.; DEVAREDDY, L. Dose-dependent effects of blackberries in the prevention of bone loss in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, 2010.

KAYS, S. J. **Postharvest physiology of perishable plant products**. Athens: Exon Press, 1997. 532p.

KHANBABAEE, K.; REE, T. Tannins: classification and definition. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 641-649, 2001.

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

KOBARDZ, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

KOBAYASHI H.; WANG C.; POMPER K. W. Phenolic content and antioxidant capacity of pawpaw fruit (*Asimina triloba* L.) at different ripening stages. **Hortscience**, v. 43, p. 268-270, 2008.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 242 p.

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

KONDO, T.; YOSHIDA, K.; NAKAGAWA, A.; KAWAI, T.; TAMURA, H.; GOTO, T. Structural basis of blue-color development in flower petals from *Cammelina communs*. **Nature Chemistry**, v. 358, p. 515-518, 1992.

KOPONEN, J. M.; HAPPONEN, A. M.; MATTILA, P. H.; TÖRRÖNEN, A. R. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1612-1619, 2007.

KUHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. **World Review of Nutrition & Dietetics**, v. 24, p. 117-191, 1976.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LAGRIMINI, L. M.; JOKY, R. J.; DUNLAP, J. R.; LIU, T. T. Y. The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 887-895, 1997.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; GOLC WONDRA. A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 214-222, 2005.

LEE, C. H.; YANG, L.; XU, J. Z.; YEUNG, S. Y. V.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Y. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. **Food Chemistry**, v. 90, p. 735-741, 2005.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 207-220, 2000.

LEONG, L. P.; SHUI, G. Na investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, v. 103, p. 69-75, 2002.

LICHTENTHALER, H. K. The 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 47-65, 1999.

- LIMA, A.; SILVA, A. M. O.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R. O. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2008.
- LIMA, E. D. P. A.; PASTORE, G. M.; LIMA, C. A. Extração e atividade da enzima polifenoloxidase em diferentes partes da pinha (*Annona squamosa* L.) nos estádios de maturação verde e maduro. **Agropecuária Técnica**, v. 22, p. 33-43, 2001.
- LIMA, M. A.; DURIGAN, J. F. Conservação de goiaba 'Pedro Sato' associando-se refrigeração com diferentes embalagens plásticas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 2, p. 232-236, 2000.
- LOKHANDE, S. D.; OGAWA, K.; TANAKA, A.; HARA, T. Effect of temperature on ascorbato peroxidase activity and flowering of *Arabidopsis thaliana* ecotypes under different light conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 57-64, 2003.
- LÓPEZ-ARANDA, J. M.; MEDINA-MÍNGUEZ, J. J.; DOMÍNGUEZ, F.; LÓPEZ, R.; SÁNCHEZ, J.; SALAS, J. Nuevas variedades para Huelva. **Hortoinformación**, v. 7, p. 26-31, 1995.
- LÓPEZ-GÁLVEZ, G.; SALTVEIT, M.; CANTWELL, M. Wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity: factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuces. **Postharvest Biology and Technology**, v. 9, p. 223-233, 1996.
- LÓPEZ-SERRANO, M.; RÓS-BARCELO, A. Peroxidase in unripe and processing strawberries. **Food Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 157-160, 1995.
- LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathological**, v. 25, p. 244-249, 1999.
- MACHEIX, J. J.; FLEURIENT, A.; BILLOT, J. **Phenolic compounds in fruit processing**. S. Mitra: CRC Press, Boca Raton, FL, EUA, pp. 295-342, 1990.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.
- MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, n. 1, p. 5-18, 2000.
- MATHOOKO, F. M. Regulation of respiration metabolism in fruits and vegetables by carbon dioxide. **Postharvest Biology and Technology**, v. 9, p. 247-264, 1996.
- MAZARO, S. M.; DESCHAMPS, C.; MIO, L. L. M.; BIASI, L. A.; GOUVEA, A.; SAUTTER, C. K. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-S-metil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 185-190, 2008.

MAZUR, W.; UEHARA, M.; WEAHÆALÆA, K.; ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogen content of berries, and plasma concentrations and urinary excretion of enterolactone after a single strawberry-meal in human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 83, p. 381-387, 2007.

MAZZAFERA, P; GONÇALVES, K. V.; SHIMIZU, M. M. Extração e dosagem da atividade da polifenoloxidase do café. **Scientia Agrícola**, v. 59, p. 695-700, 2002.

MCGHIE, T. K.; WALTON, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 702-713, 2007.

MENEGHEL, R. F. A.; BENASSI, M. T.; YAMASHITA, F. Revestimento comestível de alginato de sódio para frutos de amora-preta (*Rubus ulmifolius*). **Semina**, v. 29, n. 3, p. 609-618, 2008.

MERTZ, C.; CHEYNIER, V.; GÜNATA, Z.; BRAT, P. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8616-8624, 2007.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MITCHAM, E. J.; CRISOSTO, C. H.; KADER, A. A. Bushberry: Blackberry, Blueberry, Cranberry, Raspberry. Recommendations for maintaining postharvest quality. California: Department of Plant Sciences, University of California, Davis. Disponível em: <<http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/Producefacts/Fruit/ber0072y.shtml>>. Acesso em: 18 nov. 2012.

MODY, N.; PARHAMI, F.; SARAFIAN, T. A.; DEMER, L. L. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 509-519, 2001.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín Journal of Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

MOORE, J. N.; SKIRVIN, R.M. Blackberry management. In: SMALL FRUIT CROP MANAGEMENT. [Ed.] GALLETTA, G. J.; HIMEBRICK, D.G. New Jersey: Prentice Hall. p. 214-244, 1990.

MORELLATO, L. P. C.; LEITÃO-FILHO, H. F. **História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil**. Campinas: Editora da Unicamp/Fapesp, p. 112-140, 1992.

MORRIS, J. R.; SPAYD, S. E.; BROOKS, J. G.; CAWTHON, D. L. Influence of postharvest holding on raw and processed quality of machine harvested blackberries. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 106, n. 6, p. 769-775, 1981.

MOSCA, J. L. **Conservação pós-colheita de frutos do mamoeiro “Improved Sunrise Solo Line 72/12”, com utilização de filmes protetores e cera, associados à refrigeração.** Jaboticabal, 1992. 91f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de São Paulo.

MOURA, C. F. H. **Qualidade de pendúnculos de clones de cajueiro anão-precoce (*Anarcadium occidentale* L. var. *Nanum*) irrigado.** Fortaleza, 1998, 97f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará.

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.

MUNZ, B.; FRANK, S.; HUBNER, G.; OLSEN, E.; WERNER, S. A novel type of glutathione peroxidase: expression and regulation during wound repair. **Biochemistry Journal**, v. 1, n. 326, p. 579-585, 1997.

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

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Berry extracts: an evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology. **Food chemistry**, v. 113, p. 331-335, 2004.

O'BYRNE, D. J.; DEVARAJ, S.; GRUNDY, S. M.; JIALAL, I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids α -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 1367-1374, 2002.

OLDINI, T. L. C. **Isolamento e Identificação de Compostos com Atividade Antioxidante de Uma Nova Variedade de Própolis Brasileira Produzida por Abelhas da Espécie de *Apis mellifera*.** Piracicaba, 2007, 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

OSUNA-GARCÍA, J. A.; WALL, M. M.; WADDELL, C. A. Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of new mexican-type chile (*Capsicum annuum* L.) cultivars. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5093-5096, 1998.

OVASKAINEN, M. L.; TEORREONEN, R.; KOPONEN, J. M.; SINKKO, H.; HELLSTRÖM, J.; REINIVUO, H.; MATTILA, P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. **Journal of Nutrition**, v. 138, p. 562-566, 2008.

OZGEN, M.; REESE, R. N.; TULIO, J. A. Z.; SCHEERENS, J. C.; MILLER, A. R. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP)

and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1151-1157, 2006.

PAGOT, E. **Cultivo de pequenas frutas: amora-preta, framboesa e mirtilo**. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2006. 41 p.

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

PAOLACCI, R. M.; D'OVIDIO, R.; MARABOTTINI, R.; NALI, C.; LORENZINI, G.; ABENAVOLI, R. M.; BADIANI, M. Ozone induces a differential accumulation of phenylalanine ammonia-lyase, chalcone synthase and chalcone isomerase RNA transcripts in sensitive and resistant bean cultivars. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 425-428, 2001.

PEDISIC, S.; LEVAJ, B.; DRAGOVIC-UZELAC, V.; KOS, K. Physicochemical composition, phenolic content and antioxidant activity of sour cherry cv. Marasca during ripening. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 72, p. 295-300, 2007.

PELUSO, M. R. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, n. 8, p. 1287-1299, 2006.

PEREIRA, O. R.; SILVA, A. M. S.; DOMINGUES, M. R. M.; CARDOSO, S. M. Identification of phenolic constituents of *Cytisus multiflorus*. **Food Chemistry**, v. 131, p. 652-659, 2012.

PÉREZ, A. G.; SANZ, C.; OLÍAS, R.; RÍOS, J. J.; OLÍAS, J. M. Evolution of strawberry alcohol acyltransferase activity during fruit development and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3286-3290, 1996.

PERKINS-VEAZIE, P.; COLLINS, J. K.; CLARK, J. R. Cultivars and storage temperature effects on the shelflife of blackberry fruit. **Fruit Varieties Journal**, v. 53, n. 4, p. 201-208, 1999.

PERKINS-VEAZIE, P.; COLLINS, J. K.; CLARK, J. R.; RISSE, L. Air shipment of 'Navaho' blackberry fruit to Europe is feasible. **HortScience**, v. 32, n. 1, p. 132, 1997.

PERKINS-VEAZIE, P.; COLLINS, J. R. Cultivar and maturity affect postharvest quality fruit from erect blackberry. **HortScience**, v. 31, n. 2, p. 258-261, 1996.

PERKINS-VEAZIE, P.; COLLINS, J. K.; CLARK, J. R. Changes in blackberry fruit quality during storage. **Acta Horticulturae**, n. 352, p. 87-90, 1993.

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

PILJAC-ZEGARAC, J.; SAMEC, D. Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures. **Food Research International**, v. 44, p. 345-350, 2010.

PIO, R.; CHAGAS, E. A. Cultivo de pequenos frutos vermelhos e frutas de caroço em regiões tropicais e subtropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20, 2008. **Anais...** Vitória, 2008, CD-ROM.

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

PRIOR, R. L.; WU, X.; GU, L.; HAGER, T. J.; HAGER, A.; HOWARD, L. R. Whole berries versus berry anthocyanins: interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 647-653, 2008.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3273-3279, 2003.

PRIOR, R. L.; CAO, G.; 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 Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2686-2693, 1998.

QUIROGA, M.; GUERRERO, C.; BOTELLA, M. A.; BARCELÓ, A.; AMAYA, I.; MEDINA, M. I.; ALONSO, F. J.; DE FORCHETTI, S. M.; TIGIER, H.; VALPUESTA, V. A. Tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiology**, v. 112, p. 1119-1127, 2000.

RADTKE, J.; LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey. **Z. Ernährungswiss**, v. 37, p. 190-197, 1998.

RAPISARDA, P.; LO BIANCO, M.; PANNUZZO, P.; TIMPANARO, N. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 348-354, 2008.

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

RASEIRA, A.; SANTOS, A. M.; RASEIRA, M. C. B. Caingangue, nova cultivar de amoreira-preta para consumo 'in natura'. **HortiSul**, v. 2, n. 3, p. 11-12, 1992.

RASEIRA, M. C. B.; SANTOS, A. M.; BARBIERI, R. L. Classificação Botânica, Origem e Cultivares, In: ASPECTOS TÉCNICOS DA CULTURA DA AMORA-PRETA. [Ed.] ANTUNES, L. C.; RASEIRA, M. C. B., Embrapa-CPACT, Pelotas-RS, Junho, 2004, p. 15-28. (Embrapa Clima Temperado. Documentos 122).

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.

REYES, L. F.; VILLARREAL, J. E.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1254-1262, 2007.

RIBÉREAU-GAYON, G. Étude des mecanismes de synthese et de transformation de l'acide malique, de l'acide tartrique et de l'acide citrique chez *Vitis vinifera*. **Phytochemistry**, v. 7, n. 9, p. 1471-1482, 1968.

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.

RITTER, H.; SCHULZ, G. E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **The Plant Cell**, v. 16, p. 3426-3436, 2004.

RODRIGUEZ-GIRO, M. Envasado Bajo Atmosfera Protectora. **Alimentacion Equipas y Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 43-49, 1994.

RODRIGUEZ, M. M.; JUAREZ, M. R. **El mercado mundial de la frambuesa y zarzamora**. Chapingo, Mexico, 1995, 87 p.

ROESCH, D.; BERGMANN, M.; KNORR, D.; KROH, L.W. Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4233-4239, 2003.

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

ROUSSOS, P. A.; MATSOUKIS, A.; PONTIKIS, C. A.; CHRONOPOULOU-SERELI, A. Relations of environmental factors with the phenol content and oxidative enzyme activities of olive explants. **Scientia Horticulturae**, v. 113, n. 1, p. 100-102, 2007.

SAEG **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SAITO, K.; KOHNO, M.; YOSHIZAKI, F.; NIWANO, Y. Extensive screening for edible herbal extracts with potent scavenging activity against superoxide anions. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, p. 65-70, 2008.

SALAYA, G. F. G. **Fruticultura: Madurez de La Fruta y Manejo Poscosecha**. Fruta de clima temperado y subtropical y uva de vino. Edicione Universidade Católica do Chile, 2001.

SALUNKHE, D. K.; DESAI, B. B. **Postharvest Biotechnology of Fruits**. Boca Raton: CRC, v. 2, p. 87-92, 1984.

SAMEC, D.; PILJAC-ZEGARAC, J. Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures - Comparison with blackberries, white and red grapes. **Scientia Horticulturae**, v. 131, p. 15-21, 2011.

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

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ALVES, R. V.; OLIVEIRA, L. M.; GOMES, T. **Embalagens com atmosfera modificada**. Campinas: CETEA/ ITAL, 1998, 114 p.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. **Embalagens com Atmosfera Modificada**. Campinas: ITAL- Centro de Tecnologia de Embalagens de Alimentos, 114 p. 1996.

SAWAY, Y.; MOON, J. H.; SAKATA, K.; WATANABE, N. Effects of structure on radical-scavenging abilities and antioxidative activities of tea polyphenols: NMR analytical approach using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3598-3604, 2005.

SCALON, S. P. Q.; CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. I. F.; ABREU, M. S. Conservação de morangos (*Fragaria ananassa* Duch) cv. Sequóia em atmosfera modificada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 18, n. 3, p. 431-436, 1996.

SCALZO, J.; POLITI, A.; PELLEGRINI, N.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Genótipo da planta afeta a capacidade antioxidante total e compostos fenólicos em frutas. **Nutrition**, v. 21, p. 207-213, 2005.

SCHOPPER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1591-1602, 2001.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos e defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008, cap. 6, p. 227-248.

SCHUSTER, B.; HERMANN, K. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2761-2764, 1985.

SEERAM, N. P.; ADAMS L. S.; ZHANG, Y.; LEE, R.; SAND, D.; SCHEULLER, H. S.; HEBER, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. **Journal of Agriculture 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.

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

SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. **Biochemistry of Fruit Ripening**. London: Chapman e Hall, 1983, 454 p.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. CRC: Boca Raton, FL, v. 1, p. 558-595, 2004.

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

SHAW, D. V. Genotypic variation and genotypic correlation for sugars and organic acids of strawberries. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 113, p. 770-774, 1988.

SHIH-YUNG, H.; KAO, C. H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 38, p. 83-90, 2003.

SHUKITT-HALE, B.; CHENG, V.; JOSEPH, J. A. Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 12, p. 135-140, 2009.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, 2000, 168 p.

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

SIMÕES, A. N.; MENEZES, J. B.; ANDRADE, J. C.; FREITAS, D. F.; COSTA, F. B.; SOUZA, P. A. Caracterização química de pedúnculos de caju CCP-76 em diferentes estádios de desenvolvimento. **Caatinga**, v. 14, n. 1, p. 75-78, 2001.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W. Identification of ellagic acid in blackberry juice sediment. **Journal of Food Science**, v. 70, p. C189-C197, 2005.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E.; FINN, C. E.; PEREIRA, C. B. Influence of Cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (*Rubus* L. Hybrids) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8021-8030, 2004.

SKREDE, C.; WROLSTAD, R. E. Flavonoids from berries and grapes. *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*; Shi, J., Mazza, G., Maguer, L. M., Eds.; CRC: Boca Raton, FL, v. 2, p. 71-133, 2002.

SMIRNOFF, N.; WHEELER, G.L. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Boca Raton, v. 35, p. 291-314, 2000.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

STEVENS, R.; PAGE, D.; GOUBLE, B.; GARCHERY, C.; ZAMIR, D.; CAUSSE, M. Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, v. 31, p. 1086-1096, 2008.

STINTZING, F. C.; STINTZING, A. S.; CARLE, R.; WROLSTAD, R. E. A novel Zwitterionic anthocyanin from Evergreen blackberry (*Rubus laciniatus* Willd). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 396-399, 2002.

STODOLAK, B.; LEJA, M.; MARECZEK, A. Some aspects of metabolism of phenolics in carrot root slices. *Food, Agriculture & Environment*, v. 1, p. 88-94, 2003.

STRIK, B. C.; CLARK, J. R.; FINN, C. E.; BANADOS, M. P. Worldwide production of blackberries. *Acta Horticulturae*, v. 777, p. 209-217, 2008.

STRIK, B. C. **Berry crops: worldwide area and production systems. In Berry Fruit Value Added Products for Health Promotion**, 1^a ed.; Zhao, Y., Ed.; CRC: Boca Raton, FL, v. 1, p. 3-49, 2007.

STRIK, C. B.; CLARK, J. R.; FINN, C. E.; BAÑADOS, M. P. Worldwide blackberry production. *HortTechnology*, v. 17, p. 205-213, 2007.

SUN, J.; CHU, Y.; WU, X.; LIU, R. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 7449-7454, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAKAHAMA, U.; ONIKI, T. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant and Cell Physiology*, v. 33, n. 4, p. 379-387, 1992.

TALAVERA, S.; FELGINES, C.; TEXIER, O.; BESSON, C.; GIL-IZQUIERDO, A.; LAMAISON, J. L.; REMESY, C. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 3902-3908, 2005.

TALCOTT, S. T. **Chemical components of berry fruits. In Berry Fruit Value Added Products for Health Promotion**, 1^a ed.; Zhao, Y., Ed.; CRC: Boca Raton, FL, v. 1, p. 51-72, 2007.

TANAKA, T.; TACHIBANA, H.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I.; HSU, F. L.; KOHDA, H.; TANAKA, O. **Tannins and related compounds. CXXII. New dimeric, trimeric and tetrameric ellagitannins, lambertianins A-D, from *Rubus lambertianus* Seringe.** Chem. Pharm. Bull. 1993, 41, 1214–1220.

TATE, P.; STANNER, A.; SHIELDS, K.; SMITH, S.; LARCOM, L. Blackberry extracts inhibit UV-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA100. **Nutrition Research (N.Y.)**, v. 26, p. 100-104, 2006.

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

THOMPSON, A. K. **Tecnología Postcosecha de Frutas y Hortalizas**. Armenia: Editora Kinesis, 268p. 1998.

TSUDA, T.; HORIO, F.; UCHIDA, K.; AOKI, H.; OSAWA, T. Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2125-2132, 2003.

U.S.D.A. Department of Agriculture (USDA) national nutrient database for standard reference, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>, 2010.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v. 34, p. 68-71, 2006.

VANNUCCHI, H. A.; JORDÃO JÚNIOR, A. F. Vitaminas hidrossolúveis. In: DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, p. 191-208, 1998.

VATAI, T.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 246-254, 2009.

VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; KUKAVICA, B.; STEVANOVIC, B.; NAVARI-IZZO, F. Senescence and drought related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 8, p. 1759-1768, 2006.

VIEITES, R. L.; EVANGELISTA, R. M.; SILVA, C. S.; MARTINS, M. L. Conservação do morango armazenado em atmosfera modificada. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 2, p. 243-252, 2006.

WADA, L.; OU, B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3495-3500, 2002.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 304-309, 1997.

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

WANG, Z. H.; HSU, C. C.; YIN, M. C. Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol extracts of glossy privet fruit. **Food Chemistry**, v. 112, p. 914-918, 2009.

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

WHITWORTH, J. **Blackberry and Raspberry Culture for the Home Garden**. Oklahoma Cooperative Extension Service, HLA-6215-4, 2007. Disponível em: <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-1035/HLA-6215web.pdf>. Acesso em 12 fev. 2013.

WIELGOLASKI, F. E. Phenology in agriculture. In: LIETH, H. (Ed.). **Phenology and seasonality modeling**. London: Chapman & Hall, p. 369-381, 1974.

WILLS, R. **Postharvest: an introduction to the physiology & handling of fruit, vegetables and ornamentals**. Adelaide: Hyde Park Press, 1998, 262 p.

WRIGHT, K. P.; KADER, A. A. Effect of slicing and controlled-atmosphere storage on the ascorbate content and quality of strawberries and persimmons. **Postharvest Biological Technology**, v. 10, p. 39-48, 1997.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4069-4075, 2006.

WU, X.; PRIOR, R. L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2589-2599, 2005.

YU, J.; AHMEDNA, M., GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. **Food Chemistry**, v. 90, p. 199-206, 2005.

YURI, H.M. **Gestão de risco de granizo pelo seguro e outras alternativas: estudo de caso em pomares de maçã de Santa Catarina**. Piracicaba, 2003. 145p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.

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.

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

ZHENG, Y.; WANG, C. Y.; WANG, S. Y.; ZHEING, W. Effect of high-oxygen atmospheres on blueberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7162-7169, 2003.