



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**CINTIA DOS SANTOS MOSER**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE AMORA E FRAMBOESA: DIFERENTES**  
**CULTIVARES E ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO**

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2018**

## **PROGRAD/DBIB – Divisão de Bibliotecas**

Moser, Cintia dos Santos

Potencial antioxidante de amora e framboesa: diferentes cultivares e estágios de maturação / Cintia dos Santos Moser. – 2018.

80 f. : il.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Margarete Dulce Bagatini

Co-orientador: Prof. Dr. Clevison Luiz Giacobbo

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Fronteira Sul,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos - PPGCTAL, Laranjeiras do Sul, PR, 2018.

1. Berries. 2. Estresse oxidativo. 3. Compostos fenólicos. 4.  
Nutracêutica. I. Bagatini, Margarete Dulce, orient. II. Giacobbo,  
Clevison Luiz, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV.  
Título

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**CINTIA DOS SANTOS MOSER**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE AMORA E FRAMBOESA: DIFERENTES  
CULTIVARES E ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Margarete Dulce Bagatini.

Coorientador: Prof. Dr. Clevison Luiz Giacobbo

**LARANJEIRAS DO SUL  
2018**

CINTIA DOS SANTOS MOSER

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE AMORA E FRAMBOESA:  
DIFERENTES CULTIVARES E ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO**

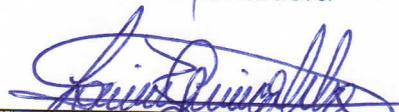
Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

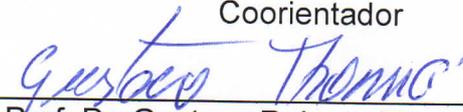
Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

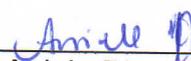
22 / 10 / 2018

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dra. Margarete Dulce Bagatini – UFFS  
Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Clevison Luiz Giacobbo – UFFS  
Coorientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gustavo Roberto Thomé – UTFPR

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dra. Anieli Pinto Kempka – UDESC

\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dra. Débora Tavares de Resende e Silva – UFFS

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Margarete Dulce Bagatini, por acreditar em mim e na realização deste trabalho, ingressando comigo em uma nova linha de pesquisa.

Ao nosso grupo de pesquisa, Aline, Beatriz, Filomena, Alessandra, Greicy e Felipe, por toda ajuda teórica e prática na realização deste trabalho e pelos momentos de descontração.

Ao meu coorientador, Clevison Luiz Giacobbo, pela amizade, confiança e por me inserir no grupo FRUFSUL, o qual fui muito bem recebida.

Aos alunos do grupo FRUFSUL, especialmente aos alunos de iniciação científica Alison e Adriana que foram meus dois braços na realização da parte prática deste trabalho, principalmente por realizar partes do trabalho em que eu, estando gestante, não deveria me expor. Vocês não só ajudaram a me tornar mestre, mas a garantir a saúde do meu filho.

Ao Solomon, por aceitar colaborar com esta pesquisa deslocando-se até a UFFS no período da noite para me auxiliar nas análises cromatográficas. Sua parceria foi muito importante.

Ao meu esposo Cleber, pela paciência, pela ajuda teórica, prática e financeira e principalmente pela disposição em viajar 840Km de Itaqui/RS à Laranjeiras do Sul/PR.

As minhas colegas Jakelynye, Viviane, Jussara e Gleicieli, que não colaboraram em nada na realização deste trabalho, mas tornaram a minha estada em Laranjeiras do Sul muito mais leve. Levarei a amizade de vocês no coração para sempre.

Foi muito bom poder contar com todos vocês, meu muito obrigada!

"A educação faz com que as pessoas sejam fáceis de guiar, mas difíceis de arrastar; fáceis de governar, mas impossíveis de escravizar."

Henry Peter

## RESUMO

O consumo de compostos antioxidantes está associado ao consumo de frutas e hortaliças e a baixa ingestão destes é relatada em diversos estudos como um dos fatores de risco para o desenvolvimento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT). Os antioxidantes são compostos químicos que podem prevenir ou diminuir os danos oxidativos de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs). As pequenas frutas (*berries*), como morango, amora, framboesa, groselha entre outras, ganham destaque por seu potencial antioxidante. Os *berries* apresentam uma série de bioativos, entre eles podemos destacar os compostos fenólicos como os ácidos fenólicos, os flavonoides, taninos e estirenos; os carotenoides como os carotenos e as xantofilas; bem como alguns ácidos orgânicos como ácido cítrico, ácido málico e ácido ascórbico. A quantidade dos compostos bioativos nas frutas variam conforme a cultivar utilizada, estágio de maturação, clima, solo e tipo de processamento empregado após a colheita. O objetivo com este estudo foi verificar o potencial antioxidante de extratos de amora e framboesa, de diferentes cultivares e estágios de maturação. Para tal, foram utilizados métodos espectrofotométricos e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a caracterização dos compostos e os métodos DPPH e ABTS para Atividade Antioxidante Total (AAT), bem como testes de viabilidade celular (MTT) e de citotoxicidade (óxido nítrico e mieloperoxidase (MPO)). O método cromatográfico utilizado neste estudo foi validado, e a partir das análises de flavonoides individuais, a aglicona principal encontrada para todas as cultivares de amora-preta estudadas ('Cherokee', 'Guarani', 'Tupy' e 'Xavante') foi a quercetina. Cada cultivar de amora apresentou um comportamento distinto quanto ao teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT), antocianinas e flavonoides entre os estágios de maturação verde, semi-maduro e maduro. Entre as framboesas a cultivar 'Heritage' demonstrou melhores teores de compostos bioativos comparados a 'Fallgoald'. Os frutos de framboesa no estágio maduro são indicados quando os compostos de interesse forem flavonoides e antocianinas e no estágio verde quando o composto de interesse for CFT para esta cultivar. Não foi possível identificar as cultivares com melhor potencial antioxidante, pois diferentes componentes da amostra podem ter apresentado maior afinidade de sequestrar o radical ABTS e outros mais eficientes para o radical DPPH. No entanto, foi possível identificar para cada cultivar, o estágio de maturação onde o composto antioxidante de interesse encontra-se em maior quantidade. Bem como, correlacionar o efeito antioxidante com os compostos bioativos, mostrando que esta relação foi com o teor de CFT, ou seja, um efeito sinérgico dos compostos estudados. O extrato de amora da cultivar 'Xavante' no estágio maduro, não apresentou citotoxicidade, aumentou a viabilidade celular e nas concentrações de 25, 50 e 100ug/mL não apresentou danos oxidativos às células e as concentrações 25, 100 e 250ug/mL reduziram significativamente a atividade da MPO. O extrato de framboesa da cultivar 'Heritage' no estágio comercial, aumentou a viabilidade celular e as concentrações de 25, 50, 100, e 250ug/mL não apresentaram danos oxidativos às células tratadas por 24 horas. As concentrações 50 e 100ug/mL foram capazes de reduzir significativamente a enzima MPO. Ou seja, a amora-preta e a framboesa vermelha apresentaram potencial para uso terapêutico, sugerindo-se assim mais estudos *in vivo*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Berries*. Estresse oxidativo. Compostos fenólicos. Nutracêutica.

## ABSTRACT

The consumption of antioxidant compounds is associated with the consumption of fruits and vegetables and their low intake is reported in several studies as one of the risk factors for the development of chronic noncommunicable diseases (CNCD). Antioxidants are chemical compounds that can prevent or lessen the oxidative damage of lipids, proteins and nucleic acids caused by reactive oxygen species (ROS). Berries are highlighted by their antioxidant potential, they present a series of bioactive compounds, among them we can highlight phenolic compounds such as phenolic acids, flavonoids, tannins and styrenes; carotenoids such as carotenes and xanthophylls; as well as some organic acids such as citric acid, malic acid and ascorbic acid. The amount of bioactive compounds in fruits varies according to the cultivar, stage of maturation, climate, soil and type of processing used after harvest. The objective of this study was to verify the antioxidant potential of blackberry and raspberry extracts from different cultivars and maturation stages. We used spectrophotometric methods and high performance liquid chromatography (HPLC) for the characterization of the compounds and the DPPH and ABTS methods for Total Antioxidant Activity (AAT), as well as cell viability (MTT) and cytotoxicity tests (nitric oxide and myeloperoxidase (MPO)). The chromatographic method used in this study was validated, and from the analyzes of individual flavonoids, the main aglycone found for all the cultivars of blackberry studied ('Cherokee', 'Guarani', 'Tupy' and 'Xavante') was quercetin. Each cultivar of blackberry presented a distinct behavior regarding the content of Total Phenolic Compounds (CFT), anthocyanins and flavonoids between the stages of unripe, semi-ripe and ripe. Among the raspberries the 'Heritage' cultivar showed better bioactive compounds compared to 'Fallgold'. Ripe raspberry fruits are indicated when the compounds of interest are flavonoids and anthocyanins and in the unripe stage when the compound of interest is CFT for this cultivar. It was not possible to identify the cultivars with the best antioxidant potential, since different components of the sample may have a higher affinity to sequester the ABTS radical and others more efficient for the radical DPPH. However, it was possible to identify for each cultivar the stage of maturation where the antioxidant compound of interest is in greater quantity. As well as, correlate the antioxidant effect with the bioactive compounds, showing that this relationship was with the CFT content, that is, a synergistic effect of the compounds studied. The ripe 'Xavante' cultivar blackberry extract showed no cytotoxicity, increased cell viability, and at concentrations of 25, 50 and 100 ug / ml showed no oxidative damage to the cells and the concentrations 25, 100 and 250 ug / ml significantly reduced the MPO activity. Raspberry extract from 'Heritage' cultivar at the ripe stage increased cell viability and concentrations of 25, 50, 100, and 250 ug / mL did not present oxidative damage to treated cells for 24 hours. Concentrations of 50 and 100ug / mL were able to significantly reduce the MPO enzyme. That is, blackberry and red raspberry presented potential for therapeutic use, thus suggesting further in vivo studies.

**KEYWORDS:** Berry. Oxidative stress. Phenolic compounds. Food analysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Geração de espécies reativas de oxigênio / nitrogênio. p.18

Figura 2. Compostos bioativos em *berries*. p.19

Figura 3. Amora-preta colhida no estágio maduro, onde as drupéolas permanecem unidas ao receptáculo. p. 21

Figura 4. Framboesa colhida no estágio maduro, onde as drupéolas separam-se do receptáculo. p. 22

Figura 5. Estágios de maturação de amora: A) Baga verde B) Baga semi-madura C) Baga madura. p.30

Figura 6. a) Amostra bruta de ‘Cherokee’ no estágio de maturação verde b) Amostra bruta de ‘Cherokee’ no estágio de maturação semi-maduro C) Amostra bruta de ‘Cherokee’ no estágio de maturação maduro d) Amostra hidrolisada de ‘Cherokee’ no estágio de maturação verde e) Amostra hidrolisada de ‘Cherokee’ no estágio de maturação semi-maduro f) Amostra ‘Cherokee’ no estágio de maturação maduro. p.77

Figura 7. a) Amostra bruta de ‘Guarani’ no estágio de maturação verde b) Amostra bruta de ‘Guarani’ no estágio de maturação semi-maduro C) Amostra bruta de ‘Guarani’ no estágio de maturação maduro d) Amostra hidrolisada de ‘Guarani’ no estágio de maturação verde e) Amostra hidrolisada de ‘Guarani’ no estágio de maturação semi-maduro f) Amostra hidrolisada de ‘Guarani’ no estágio de maturação maduro. p.78

Figura 8. a) Amostra bruta de ‘Tupy’ no estágio de maturação verde b) Amostra bruta de ‘Tupy’ no estágio de maturação semi-maduro C) Amostra bruta de ‘Tupy’ no estágio de maturação maduro d) Amostra hidrolisada de ‘Tupy’ no estágio de maturação verde e) Amostra hidrolisada de ‘Tupy’ no estágio de maturação semi-maduro f) Amostra hidrolisada de ‘Tupy’ no estágio de maturação maduro. p.79

Figura 9 a) Amostra bruta de 'Xavante' no estágio de maturação verde b) Amostra bruta de 'Xavante' no estágio de maturação semi-maduro c) Amostra bruta de 'Xavante' no estágio de maturação maduro d) Amostra hidrolisada de 'Xavante' no estágio de maturação verde e) Amostra hidrolisada de 'Xavante' no estágio de maturação semi-maduro f) Amostra hidrolisada de 'Xavante' no estágio de maturação maduro. p.80

Figura 10. Viabilidade de células expostas por 24h a diferentes concentrações de extrato de amora da cultivar 'Xavante' no estágio maduro. p.44

Figura 11. Efeito de diferentes concentrações de extrato de amora, da cultivar 'Xavante' no estágio maduro, na produção de óxido nítrico em células tratadas por 24h. p.45

Figura 12. Efeito de diferentes concentrações de extrato de amora, da cultivar 'Xavante' no estágio maduro, na produção da enzima MPO em células tratadas por 24h. p.47

Figura 13. Estágios de maturação de framboesa: a) 'Heritage' baga verde b) 'Heritage' baga madura c) 'Fallgoald' baga verde d) 'Fallgoald' baga madura. p.54

Figura 14. Viabilidade de células expostas por 24h a diferentes concentrações de extrato de framboesa da cultivar 'Heritage' no estágio maduro. p.61

Figura 15. Efeito de diferentes concentrações de extrato de framboesa, da cultivar 'Heritage' no estágio maduro, na produção de óxido nítrico em células tratadas por 24h. p.63

Figura 16. Efeito de diferentes concentrações de extrato de framboesa, da cultivar 'Heritage' no estágio maduro, na produção da enzima MPO em células tratadas por 24h. p.64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Faixa linear, equação de regressão, coeficiente de determinação e limite de determinação e quantificação para miricetina, quercetina e kaempferol. p.36

Tabela 2. Concentração média, desvio padrão e desvio padrão relativo de cinco repetições de mirecetina, quercetina e kaempferol. p.36

Tabela 3. Concentração média, desvio padrão, desvio padrão relativo e erro relativo das análises de miricetina, quercetina e kaempferol realizadas em três dias consecutivos. p.37

Tabela 4. Percentuais de recuperação de mirecetina, quercetina e kaempferol em amora e framboesa. p.38

Tabela 5. Concentração média de quercetina e desvio padrão de diferentes amostras hidrolizadas de amora em diferentes estágios de maturação. p.39

Tabela 6- Conteúdo de Flavonoides, Antocianinas, CFT e Atividade antioxidante total de amora em diferentes cultivares e estágios de maturação. p.41

Tabela 7- Conteúdo de Antocianinas, Flavonoides de framboesas de diferentes cultivares e estágios de maturação. p.59

Tabela 8- Conteúdo de Compostos fenólicos Totais e Atividade antioxidante total de diferentes cultivares de framboesa. p.60

Tabela 9- Conteúdo Compostos fenólicos Totais e Atividade antioxidante total de diferentes estágios de maturação de framboesa. p.60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAT – Atividade Antioxidante Total
- ABTS – radical 2,2- azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
- AG – Ácido Gálico
- ANOVA – Análise de variância
- Cfa – Clima Subtropical úmido
- CFT – Compostos Fenólicos Totais
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CLAE-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- cNOS – óxido nítrico constitutivo
- DCNT – Doenças Crônicas Não Transmissíveis
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- DP – Desvio Padrão
- EAG – Equivalente de ácido gálico
- EC<sub>50</sub> – inibição de 50% da concentração inicial do radical DPPH
- ERCs – Espécies reativas de cloro
- ERNs – Espécies reativas de nitrogênio
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power
- MF – massa fresca
- HCl – Ácido clorídrico
- HOCl – Ácido hipocloroso
- HRO<sub>2</sub><sup>-</sup> – radical hidroperoxila
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio
- iNOS – óxido nítrico indutível
- IC – inclinação da curva analítica
- LC-MS – cromatografia líquida com espectrômetro de massas
- LDL – Lipoproteínas de baixa densidade
- LOD – Limite de Detecção
- LOQ – Limite de Quantificação
- MF – massa fresca

MPO – Mieloperoxidase

MTT – 3-(4, 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

OH – radicais hidroxila

ON – Óxido Nítrico

ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity

O<sub>2</sub><sup>-</sup> – ânion superóxido

PBS – solução salina tamponada com fosfato

R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação

RO<sub>2</sub> – Radical peroxila

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

TEAC – Capacidade antioxidante de equivalente de trolox

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – oxigênio singlete

%DPR – Desvio Padrão Relativo

%ER – Erro Relativo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 OBJETIVOS.....	15
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	15
1.1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	15
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
2.1 ESTRESSE OXIDATIVO.....	17
2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS EM BERRIES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	18
2.3 AMORA E FRAMBOESA.....	21
2.4 ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO DE FRUTOS.....	23
2.5 MÉTODOS PARA AVALIAR ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> .....	24
<b>3. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES CULTIVARES E ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO DE <i>RUBUS SPP.</i></b> .....	<b>27</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	29
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.2.1 EXTRAÇÃO.....	30
3.2.2 FLAVONOIDES INDIVIDUAIS (CLAE-DAD).....	31
3.2.3 ANTOCIANINAS E FLAVONOIDES TOTAIS.....	32
3.2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT).....	33
3.2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL ATRAVÉS DO MÉTODO ABTS.....	33
3.2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL ATRAVÉS DO MÉTODO DPPH.....	33
3.2.7 CULTIVO CELULAR.....	34
3.2.8 VIABILIDADE CELULAR.....	34
3.2.9 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (ON).....	35
3.2.10 MIELOPEROXIDASE (MPO).....	35
3.2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.4 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
<b>4. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES CULTIVARES E ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO DE FRAMBOESA</b> ..	<b>51</b>
4.1 INTRODUÇÃO.....	53
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.2.1 EXTRAÇÃO.....	55
4.2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT).....	55
4.2.3 ANTOCIANINAS E FLAVONÓIDES TOTAIS.....	55
4.2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL ABTS.....	56
4.2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DPPH.....	56
4.2.6 CULTIVO CELULAR.....	57
4.2.7 VIABILIDADE CELULAR.....	57
4.2.8 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (ON).....	57
4.2.9 MIELOPEROXIDASE (MPO).....	58
4.2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.4 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	66
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo de compostos antioxidantes está associado ao de frutas e hortaliças, e a baixa ingestão destes é relatada em diversos estudos como um dos fatores de risco para o desenvolvimento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) (OLIVEIRA-CAMPOS et al., 2013; SILVA; FIGUEIREDO; SOARES, 2016; VIANA et al., 2016). O aumento do consumo de frutas e hortaliças de 18,2% (2010) para 24,3% (2022) está no Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das DCNT no Brasil, pois essas doenças como o diabetes, a hipertensão e o câncer, por exemplo, constituem o problema de saúde de maior magnitude e correspondem a cerca de 70% das causas de mortes no país (BRASIL, 2011).

Os antioxidantes são compostos químicos que podem prevenir ou diminuir os danos oxidativos de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs). O organismo humano possui dois sistemas de defesa antioxidante, o endógeno constituído pelas enzimas (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) presentes no organismo, responsáveis pelo metabolismo e controle da homeostasia deste. E o sistema antioxidante exógeno, referente a compostos bioativos ingeridos via dieta tais como ácido ascórbico, carotenoides e os compostos fenólicos, que são encontrados em diferentes concentrações em frutas e hortaliças (FREIRE et al., 2013).

As pequenas frutas (*berries*), especialmente as frutas vermelhas, como morango, amora, framboesa, groselha entre outras, ganham destaque por seu potencial antioxidante. Dentre os compostos bioativos encontrados nessa classe de frutas temos os flavonoides, subclasse flavonóis (quercetina, miracetina, kaempferol), os ácidos orgânicos (ácidos cítrico e málico) e o ácido ascórbico (vitamina C) (MILIVOJEVIĆ et al., 2013).

A quantidade dos compostos bioativos presentes nas frutas variam conforme a cultivar utilizada, estágio de maturação, clima, solo e tipo de processamento empregado após a colheita (MILIVOJEVIĆ et al., 2013; PINELI, 2009; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008; ZIA-UL-HAQ et al., 2014).

Estudos realizados com diferentes cultivares de amora encontraram diferença na composição de compostos bioativos e na atividade antioxidante entre as cultivares (CELANT et al., 2016; GUEDES et al., 2014). No estudo realizado por Celant et al. (2016) o teor de compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides, bem como a capacidade antioxidante de amora-preta produzidas sob as mesmas condições apresentaram variações entre as cinco cultivares avaliadas. Guedes et al. (2014)

também encontraram diferença na composição de compostos fenólicos e do potencial antioxidante ao estudar diferentes cultivares de amora-preta e vermelha. A variação nos teores de flavonoides nestes frutos é influenciada pelo genótipo, permitindo através de melhoramento genético o desenvolvimento de materiais com concentrações elevadas de flavonoides e, portanto, maiores propriedades nutracêuticas (GUEDES et al., 2014).

Em relação à composição de compostos fenólicos e capacidade antioxidante em diferentes estágios de maturação, Soutinho et al. (2013) verificaram evoluções diferentes para as três frutas estudadas (mirtilo, groselha e framboesa). No início da maturação a groselha apresentava um valor de compostos fenólicos totais superiores em relação aos outros dois frutos. Porém, foi observado uma tendência para diminuição desses valores. Ao longo da maturação do fruto, o teor em compostos fenólicos totais manteve-se aproximadamente constante para a framboesa e para o mirtilo. Os valores de atividade antioxidante para framboesa, no final da maturação, foram semelhantes ao início da maturação. Na groselha os valores de atividade antioxidante diminuíram 50% ao longo da maturação. E os extratos de mirtilo apresentaram valores mais elevados (17 a 55%) quando comparados com o início do período de maturação (SOUTINHO et al., 2013).

A partir dos estudos citados acima percebe-se a grande variação no conteúdo de compostos bioativos entre as cultivares de uma mesma fruta, bem como nos diferentes estágios de maturação da mesma cultivar. No geral, não se observa na literatura um padrão de comportamento quanto aos teores de compostos bioativos e da capacidade antioxidante ao longo do período de maturação das frutas, o que pode indicar um comportamento distinto para cada espécie e cultivar frutífera.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o potencial antioxidante de extratos de amora e framboesa, de diferentes cultivares e estágios de maturação.

### 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os compostos bioativos presentes nos *berries* por métodos espectrofotométricos e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Verificar as cultivares com melhor potencial antioxidante;
- Identificar o período de maturação ideal quanto aos níveis de antioxidantes;

- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* utilizando diferentes métodos;
- Correlacionar o efeito antioxidante com os níveis de compostos bioativos;
- Testar o efeito de extratos de *berries* sobre a viabilidade celular, produção de óxido nítrico e atividade da enzima mieloperoxidase em células polimorfonucleares.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

No organismo humano saudável, há um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e antioxidantes. Em doenças, pode ocorrer um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e antioxidantes, o denominado estresse oxidativo (OU; NEMZER, 2014).

O estresse oxidativo é caracterizado por uma intensa sobrecarga de radicais livres, que pode ser extremamente lesiva às estruturas celulares, com consequências tumorigênicas. A lesão oxidativa de material genético, também possui estreita relação com a tumorigênese (GOMES, 2007). O estresse oxidativo causa oxidação de biomoléculas com desequilíbrio homeostático ou perda de suas funções biológicas, ocasionando danos em células e tecidos. Os lipídios das membranas celulares são os principais alvos do ataque por radicais livres (GIL-CHÁVEZ et al., 2013; YIN; XU; PORTER, 2011).

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) é um termo coletivo utilizado para designar moléculas altamente reativas resultantes do metabolismo do oxigênio, incluindo radicais livres, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), os radicais hidroxila (OH), peroxila ( $RO_2$ ) e hidroperoxila ( $HRO_2^-$ ), assim como espécies que não possuem radicais livres, mas que são agentes oxidantes e podem gerar radicais, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (EVANS et al., 2002; WISEMAN; HALLIWELL, 1996).

As EROs promovem uma reação em cadeia que acontece em três etapas. A primeira etapa é a iniciação, caracterizada pela formação da ERO, ou seja, fotossensibilização, derivações metabólicas do oxigênio, a segunda etapa é a propagação, que ocorre quando a ERO reage com um substrato, e a última etapa, término, que é a interrupção da reação em cadeia (GROSSWEINER, 2007).

Durante o metabolismo aeróbico em células normais, adenosina trifosfato é gerado e o oxigênio é reduzido à água. No entanto, este processo não é perfeito e como resultado são produzidos subprodutos tóxicos na forma de EROs, espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e espécies reativas de cloro (ERCs) (OU; NEMZER, 2014). Na figura 1, está representado um fluxograma da formação de EROs e ERNs.

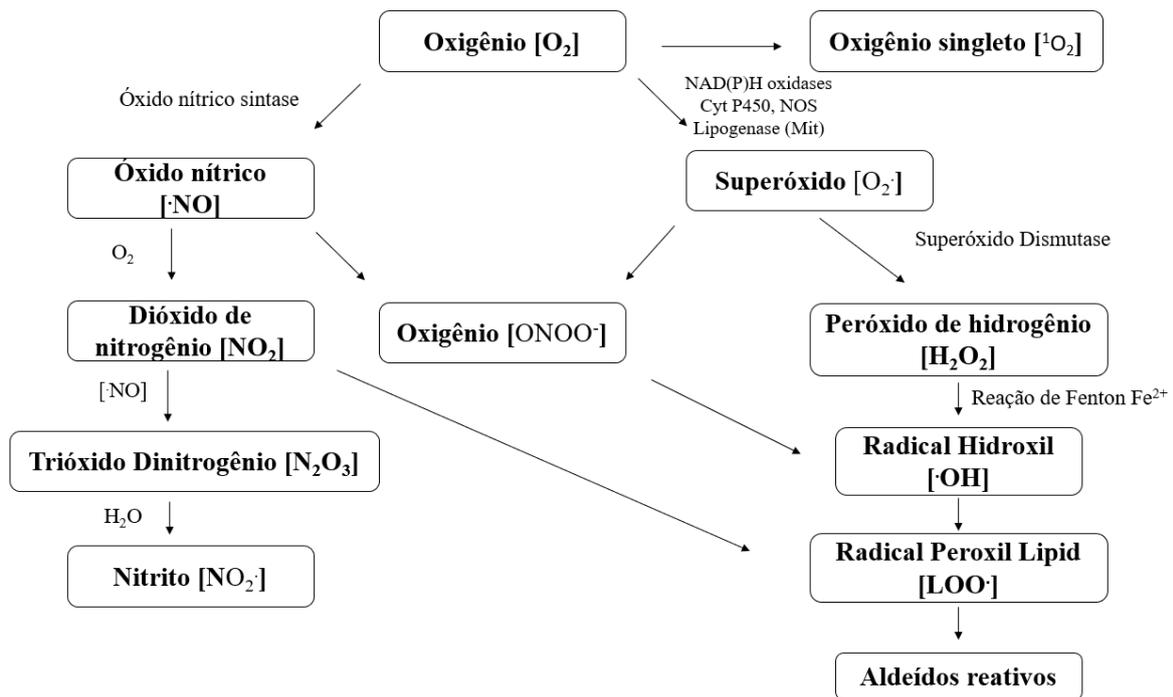


Figura 1. Geração de espécies reativas de oxigênio / nitrogênio.

Fonte: Adaptado Prior; Sintara; Chang, 2016.

## 2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS EM BERRIES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os *berries* apresentam uma série de compostos bioativos, entre eles podemos destacar os compostos fenólicos como os ácidos fenólicos, os flavonoides, taninos e estirenos; os carotenoides como os carotenos e as xantofilas; bem como alguns ácidos orgânicos como ácido cítrico, ácido málico e ácido ascórbico, figura 2 (MANGANARIS et al., 2014; MILIVOJEVIĆ et al., 2013).

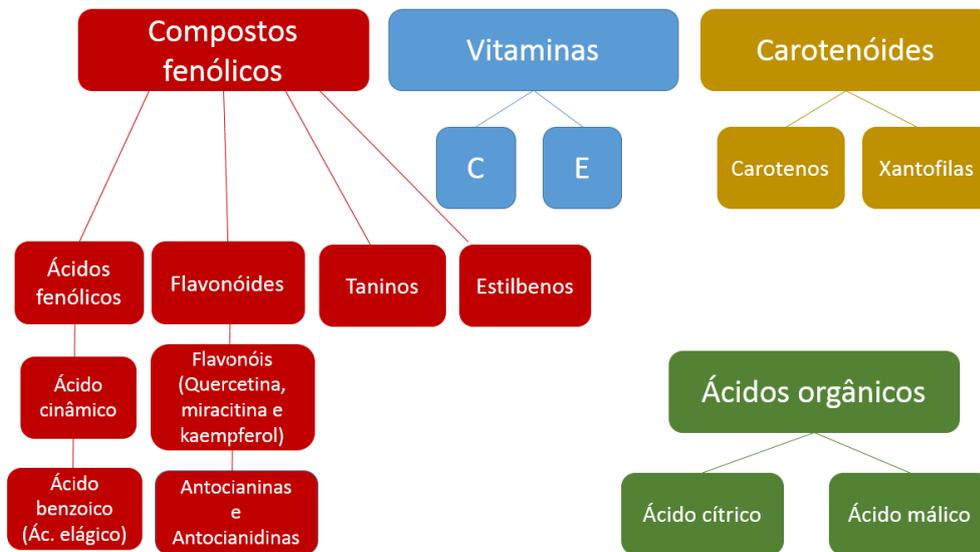


Figura 2. Compostos bioativos em *berries*.

Fonte: adaptado Manganaris et al, 2014.

De Souza et al. (2014) avaliaram os compostos bioativos de *berries* produzidos nas áreas subtropicais do Brasil e compararam com dados da literatura, o teor de compostos fenólicos variaram de 305,38 a 850,52mg GAE/100 g. A amora-preta (850,52mg GAE/100 g) e o morango (621,92mg GAE/100 g) puderam ser classificados com elevada concentração de fenóis, segundo a classificação de Vasco, Ruales e Kamal-Eldin (2008) que considera alto, valores acima 500mg GAE/100 g. Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere o poder antioxidante (ANGELO; JORGE, 2007).

Ao avaliar o perfil bioquímico e a capacidade antioxidante de seis espécies de quatro gêneros diferentes de *berries*, Milivojević et al. (2013), encontraram grande variabilidade quanto ao teor de flavonóis. As groselhas se destacaram com o maior teor médio de mirecetina em groselha preta 'Ben Sarek' e *V. myrtilus*, enquanto os valores mais elevados de quercetina foram observados em groselhas pretas, morango selvagem e mirtilo 'Bluecrop' (mais de 4  $\mu\text{g g}^{-1}\text{FW}$ ) (MILIVOJEVIĆ et al., 2013).

Os flavonoides apresentam propriedades antioxidantes e quelantes, inativam as EROs, atuando contra a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e melhorando a inflamação dos vasos sanguíneos. Estes também reduzem a atividade das enzimas xantina oxidase e a

nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase, enzimas que estimulam a produção de EROs (MAJEWSKA-WLWRZBICKA; CZECZOT, 2012).

Em trabalhos conduzidos por outros autores, verifica-se que a capacidade antioxidante em frutas está correlacionada principalmente com o teor de compostos fenólicos totais (BAGETTI et al., 2011; MILIVOJEVIĆ et al., 2013; SEGANTINI et al., 2015). Em framboesas vermelhas as propriedades antioxidantes estão associadas ao elevado conteúdo de ácidos fenólicos, ácido elágico, antocianinas e elagitaninos. Antocianinas e elagitaninos são os principais compostos fenólicos, representando praticamente 85% do conteúdo total, e estes são responsáveis por 50% do poder antioxidante (BRADISH et al., 2012). O princípio da atividade antioxidante é baseado na disponibilidade de elétrons para neutralizar os radicais livres. Além disso, a atividade antioxidante está relacionada com o número e a natureza do padrão de hidroxilação no anel aromático e a capacidade de atuar como doador de hidrogênio. A inibição da oxidação melhora com o aumento do número de grupos hidroxil no anel de fenol (GÜLÇIN, 2012).

A amora se destaca entre os *berries* avaliados por De Souza et al. (2014) por exibir a maior atividade antioxidante e os mais altos níveis de fenóis, flavonoides, antocianinas e carotenoides. Existem, aproximadamente, 600 carotenoides encontrados na natureza, os quais são constituídos por dois grandes grupos, denominados: (1) carotenos, que consistem em hidrocarbonetos puros; e (2) xantofilas, hidrocarbonetos que possuem grupos funcionais oxigenados (HAEGELE et al., 2000). Os carotenoides tem potencial antioxidante por impedirem a propagação da reação em cadeia promovida por EROs. Estes promovem a cessação, servindo como substrato para as EROs ou produtos desencadeantes, provenientes de uma reação de uma ERO com um substrato, para que não sejam formados novos produtos desencadeantes que dariam continuidade à reação em cadeia (GOMES, 2007).

Jacques et al. (2015) analisaram os compostos bioativos de Amora-preta (*rubus fruticosus*) ‘Tupy’, da safra de 2010 de uma área experimental do município de Pelotas-RS. O teor de compostos fenólicos totais foi de 709,98 mg.100g<sup>-1</sup>, antocianinas totais 110,73 mg.100g<sup>-1</sup>, ácido ascórbico 1,08 mg.100g<sup>-1</sup> e tocoferóis totais 0,87 mg.100g<sup>-1</sup>, a quantidade muito baixa de tocoferóis pode ser explicado pelo baixo conteúdo de gordura presente nesse fruto (JACQUES et al., 2015).

Quanto aos ácidos orgânicos em *berries*, Milivojević et al. (2013), encontraram como principal ácido orgânico o ácido cítrico, sendo encontrado ácido málico em quantidades duas vezes mais baixas em todos os morangos e mirtilos testados. Framboesas e groselhas apresentaram quantidades de ácido cítrico três vezes maiores do que o ácido málico, enquanto que em groselhas pretas essa razão foi de 5: 1. No entanto, a quantidade de ácido málico foi dominante em amoras.

Os *berries* foram apontados ainda como ricas fontes de vitamina C, por apresentarem valores médios acima de 40 mg por 100 g de peso fresco (MILIVOJEVIĆ et al., 2012 e 2013). Os antioxidantes adquiridos através da dieta, como a vitamina C, são extremamente importantes na intercepção dos radicais livres oriundos de processos oxidativos (KITTS, 1997). A atividade antioxidante da vitamina C envolve a transferência de um elétron ao radical livre e a consequente formação do radical ascorbato (ROSA et al., 2007). Além disso, a vitamina C é capaz de agir em sinergismo com a vitamina E e de agir na regeneração desta. Enquanto a vitamina C é um importante antioxidante solúvel em água, que em fluidos extracelulares é capaz de neutralizar EROs na fase aquosa antes que eles possam atacar lipídios. A vitamina E é um importante antioxidante lipossolúvel, que age como o antioxidante de quebra de cadeia dentro da membrana celular e desempenha um papel importante na proteção dos ácidos graxos da membrana contra a peroxidação lipídica (PRIOR, 2015).

### 2.3 AMORA E FRAMBOESA

A amora (*Rubus* sp) pertence à família *Rosaceae*, gênero *Rubus* e subgênero *Eubatus*. As amoras são frutos compostos, constituídos por numerosas drupéolas, que envolvem o receptáculo. O fruto destaca-se do pedicelo, mas o receptáculo permanece firmemente aderente à polpa, mesmo quando maduro (Figura 3). Os frutos são delicados e succulentos, saborosos e aromáticos. Apresentam formas, oblongas, por vezes arredondas e a dimensão e o peso são muito variáveis (2-12g) (SOUSA, 2007a).



Figura 3. Amora-preta colhida no estágio maduro, onde as drupéolas permanecem unidas ao receptáculo.

Fonte: Autores, 2018.

A framboesa pertence à família das *Rosaceae*, gênero *Rubus*, e subgênero *Idaeobatus*. É um fruto múltiplo, de drupéolas estreitamente unidas à volta do receptáculo. Apresenta, em geral, forma

cônica arredondada, sendo cada drupéola, constituída por uma semente dura envolvida por polpa. O fruto destaca-se do receptáculo, enquanto que o receptáculo permanece aderente à planta, quando maduro, sendo colhido somente as drupéolas (figura 4) (SOUSA, 2007b).



Figura 4. Framboesa colhida no estágio maduro, onde as drupéolas separam-se do receptáculo.

Fonte: Autores, 2018.

Os estados que se destacam na produção de amoreira-preta e de framboeseira são Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Sul de Minas Gerais (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010). A framboeseira (*Rubus idaeus L.*) é uma frutífera de clima temperado, que juntamente com a amoreira-preta (*Rubus sp.*), vem destacando-se no mercado das pequenas frutas nos últimos anos (MACEDO et al., 2012).

Embora haja espécies nativas do Brasil de amoreira-preta, as cultivares utilizadas atualmente no país são oriundas de cruzamentos envolvendo material genético nativo dos estados Unidos (ANTUNES et al., 2014).

A cultivar ‘Cherokee’ foi uma das primeiras a ser introduzida no Brasil através do programa de melhoramento da amoreira-preta na década de 70 (ANTUNES et al, 2014). Outras cultivares foram lançadas pelo programa de melhoramento da Embrapa Clima Temperado, como ‘Tupy’ e ‘Guarani’, em 1988; e ‘Xavante’, em 2004 (RASEIRA; FRANZON, 2012).

‘Tupy’ é a cultivar considerada mais importante no Brasil e em todo o mundo, devido a sua elevada produtividade e à qualidade dos frutos (VOLK et al., 2013). Apresenta frutos com boa aceitação no mercado *in natura*, devido ao seu tamanho, uniformidade, firmeza, coloração intensa e sabor (ANTUNES et al, 2014).

O cultivo da amoreira-preta vem crescendo nos últimos anos devido a vários fatores econômicos e sociais, que também ocorre devido as suas qualidades fitoquímicas, que podem trazer benefícios à saúde, a partir da busca por uma alimentação mais saudável (ANTUNES et al, 2014).

As cultivares de amoreira podem variar quanto à composição de compostos bioativos, bem como no potencial antioxidante, segundo Guedes et al., 2014 (Quadro 1).

Quadro 1. Teores médios de fenóis totais, flavonoides, antocianinas, licopeno,  $\beta$ - caroteno e vitamina A em frutos de cultivares de amoreira. UFLA, Lavras-MG, 2013.

Cultivares	Fenóis	Flavonoides	Antocianinas	Licopeno	$\beta$ -caroteno	Vit. A
	totais					
	-----mg.100g <sup>-1</sup> MF-----			-----mcg.100g <sup>-1</sup> MF-----		
<b>‘Cherokee’</b>	433,53	79,21	364,87	49,81	48,82	4,10
<b>‘Guarani’</b>	147,86	71,36	333,19	31,07	17,65	1,48
<b>‘Tupy’</b>	247,33	60,57	371,17	35,95	32,28	2,71
<b>‘Xavante’</b>	671,45	128,53	531,23	91,62	183,24	15,39

\*MF=massa fresca

Fonte: adaptado Guedes et al., 2014.

A coloração das framboesas varia de acordo com as espécies e as cultivares, variando do amarelo ao preto, incluindo os tons alaranjado, rosa, vermelho claro e intenso e púrpura. A espécie *Rubus idaeus* apresenta cultivares de coloração vermelha ('Heritage', 'Polana', 'Autumn Bliss' e 'Batum') e amarelas ('Golden Bliss' e 'Fall Gold') e a *R. niveus* framboesa-negra, por exemplo (MOURA et al., 2012; SOUSA, 2007b).

Diferenças quanto ao teor de compostos bioativos e atividade antioxidante também são encontrados para diferentes cultivares de framboesa. No estudo realizado por Maksimovic et al., (2013), na Universidade de Belgrado na Sérvia, o teor de compostos fenólicos totais (3,72 e 3,14mg equiv. AG 100 g<sup>-1</sup> MF) e de antocianinas (11,95 e 10,56mg equiv. cyanidin-3-glucoside equiv. 100g<sup>-1</sup> MF) foi superior para ‘Autumn Bliss’ em relação a ‘Polka’, respectivamente. E o teor de ácido ascórbico foi superior para ‘Polka’ 42,9mg 100g<sup>-1</sup> MF em relação a ‘Autumn Bliss’ 38,4 mg 100g<sup>-1</sup> MF. Atividade antioxidante total para Polka foi de 1,94 e para Autumn Bliss de 2,12mg equiv.de ácido ascórbico g<sup>-1</sup> MF.

## 2.4 ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO DE FRUTOS

A maturação é a fase do desenvolvimento caracterizada por uma sequência de transformações bioquímicas, fisiológicas e estruturais, por meio das quais os frutos emergem do

estágio incompleto para atingir o crescimento pleno e a máxima qualidade comestível (CHITARRA; CHITARRA, 2006). Sendo assim, o amadurecimento corresponde a mudanças nos fatores sensoriais de sabor, odor, cor e textura. O amadurecimento pode ocorrer na planta (frutas não-climatéricas) ou após a colheita (frutas climatéricas) (CHITARRA; CHITARRA, 2006).

Além de aprimorar atributos sensoriais a sequência de transformações que ocorrem no processo de maturação influencia no teor de compostos bioativos, sendo que a modificação da cor, evidência mais perceptível do início da maturação, ocorre devido à degradação da clorofila e ao acúmulo de carotenoides e de flavonoides. Portanto, no que diz respeito aos pigmentos, o amadurecimento pode ser caracterizado como dois movimentos simultâneos, opostos e coordenados: um biossintético e outro degradatório (KERBAUY, 2012).

Em frutas carotenogênicas, o amadurecimento é geralmente acompanhado de carotenogênese aumentada a medida que as clorofilas se decompõem e os cloroplastos são transformados em cromoplastos. O padrão simples de carotenóides do cloroplasto dá lugar a uma composição complexa, os carotenóides aumentam dramaticamente em número e quantidade (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). No entanto, o estudo de Rutz; Voss; Zambiazzi, (2012) que investigou o efeito da maturidade nos teores de carotenóides na polpa de Amora, apontou que o conteúdo destes diminuiu com a maturação da fruta. O conteúdo de Luteína e zeaxantina foram de 0,66  $\mu\text{g/g}$  no estágio imaturo, 0,235  $\mu\text{g/g}$  no estágio intermediário e zero no estágio maduro, e o conteúdo de  $\beta$ -caroteno foi de 0,4  $\mu\text{g/g}$ , 0,078  $\mu\text{g/g}$  e 0,162  $\mu\text{g/g}$  respectivamente para os mesmos estágios de maturação.

No processo de maturação da amora foi observado por Zielinski et al (2015) que o peso, tamanho, diâmetro e teor de açúcar aumentaram significativamente enquanto a acidez diminuiu. Os teores de antocianinas aumentaram de 4,19  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  frutos semi-maduros para 168,53  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  frutos maduros para a cultivar ‘Tupy’ e de 5,68  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  frutos semi-maduros para 205,75  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  frutos maduros do cultivar ‘Brazos’. Os maiores teores de compostos fenólicos foram verificados para os frutos verdes das duas cultivares (ZIELINSK et al., 2015).

## 2.5 MÉTODOS PARA AVALIAR ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Em uma revisão quanto à atividade oxidante de constituintes alimentares Gülçin (2012), aponta uma grande diversidade de métodos para a determinação de antioxidantes e que estes podem responder de maneira diferente a diferentes fontes radicais ou oxidantes. Por exemplo, os carotenoides não são bons extintores de radicais peroxil em relação aos fenólicos e outros

antioxidantes, mas sim na extinção do oxigênio singlete, no qual outros fenólicos e antioxidantes são relativamente ineficazes.

Respostas muito divergentes às diferentes fontes de radicais são evidentes, a proteção máxima pode diferir bastante para cada alimento, como observado a partir dos dados de uma amostragem de três diferentes *berries* (baga seca congelada), morangos, amoras, e mirtilos. Para morangos, a proteção antioxidante ocorre contra o radical peroxil e ânion superóxido, principalmente. A amora exibe uma proteção mais forte contra o oxigênio singlete do que contra o radical peroxil. O mirtilo contém uma proteção equilibrada contra o radical peroxil, oxigênio singlete e ânion superóxido. E a proteção contra o peroxinitrito é bastante baixa para todos os alimentos testados em relação às outras fontes radicais (PRIOR, 2015).

Sucupira et al. (2012), fizeram uma revisão sobre os diferentes métodos para avaliar a atividade antioxidante em frutos e chegaram a conclusão de que dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante de uma substância devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação. Assim, para caracterizar completamente um composto como antioxidante a avaliação não deve se basear apenas em uma única metodologia (OLIVEIRA, 2015).

Os ensaios mais utilizados para testar a capacidade antioxidante total de alimentos *in vitro* são: capacidade de remoção de um radical peroxil (ORAC- oxygen radical absorbance capacity), capacidade de reduzir metal (FRAP- ferric reducing antioxidant power), a capacidade de remoção de radical orgânico 2,20-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico) (ABTS) e o método baseado na peroxidação do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Vários problemas são relatados quanto a estes métodos gerarem resultados inconsistentes, confusos e difíceis de comparar e principalmente quanto à falta de relevância biológica (OU; NEMZER, 2014; RODRIGUES – AMAYA, 2016).

Através do método ORAC é medido o decréscimo da fluorescência de proteínas, como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer dano oxidativo. As ficobiliproteínas  $\beta$ -ficoeritrinas, que são altamente fluorescentes por conter um pigmento vermelho fotorreceptor, são as molécula alvo dos radicais livres de oxigênio (PRIOR; CAO, 1999).

No método FRAP, na presença de um antioxidante e em condições ácidas, o complexo férrico-tripiridiltriazina (FeIII-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (FeII -TPZ). O complexo formado por esta reação possui uma coloração azul intensa, com absorção máxima a 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996).

O método de capacidade antioxidante de equivalente de trolox (TEAC) é um método utilizado para medir a atividade antioxidante total através da captura do radical ABTS. O ABTS $\bullet$ +, cor azul esverdeado, é gerado pela reação do ABTS com persulfato de potássio e através da adição de um antioxidante ocorre a redução do ABTS $\bullet$ + a ABTS, havendo a descoloração do meio reacional. Com a perda de cor, a porcentagem de inibição do ABTS $\bullet$ + é determinada em função do Trolox, um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante. Este método apresenta vantagem em relação a outros, pois pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis (KUSKOSKI et al., 2005; SUCUPIRA et al., 2012). Este método tem sido utilizado em vários tipos de frutos como acerola, goiaba, camu-camu, açaí, maracujá, pitanga, entre outros (SUCUPIRA et al., 2012).

Quanto ao método DPPH, é um método utilizado em mais de 90% dos estudos de avaliação antioxidante de substâncias puras, misturas ou matrizes complexas como a dos alimentos, e é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade (MOON; SHIBAMOTO, 2009; SUCUPIRA et al., 2012). Este método foi desenvolvido por Blois (1958) utilizando um radical livre estável semelhante,  $\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazila, e posteriormente modificado por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995) simplificando a interpretação do resultado utilizando o termo concentração eficaz que inibe 50% da concentração inicial do radical DPPH ( $EC_{50}$ ). Esse método continua sofrendo muitas modificações e vários protocolos para o DPPH têm sido relatados, incluindo diferentes solventes para dissolver o radical DPPH, diferentes concentrações iniciais da solução de DPPH, diferentes alíquotas das várias substâncias utilizadas e da solução inicial de DPPH, diferentes tempos de reação com o radical DPPH e diferentes absorbâncias também têm sido relatadas (OLIVEIRA, 2015).

### 3. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES CULTIVARES E ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO DE *Rubus* spp.

#### RESUMO

O consumo de frutas aumentou globalmente frente aos benefícios comprovados de sua ingestão regular na promoção da saúde. Nesta perspectiva, o cenário mundial é de crescimento no mercado para amora-preta principalmente devido aos benefícios a saúde por suas qualidades fotoquímicas. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar os compostos bioativos e testar a atividade antioxidante *in vitro* em amora-preta de diferentes cultivares e estágios de maturação. Para tal, foram utilizados métodos espectrofotométricos e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a caracterização dos compostos e os métodos DPPH e ABTS para Atividade Antioxidante Total (AAT), bem como testes de viabilidade celular (MTT) e de citotoxicidade (óxido nítrico e mieloperoxidase (MPO)). O método cromatográfico utilizado neste estudo foi validado e a partir das análises de flavonoides individuais a quercetina foi a aglicona principal encontrada para todas as cultivares de amora. Através dos métodos espectrofotométricos foi possível verificar que cada cultivar de amora-preta apresenta um comportamento distinto quanto ao teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT), antocianinas e flavonoides entre os estágios de maturação estudados. Ou seja, cada cultivar tem um período específico em que o teor destes compostos bioativos está potencializado. A AAT, pelo método DPPH, apresentou comportamento distinto para cada cultivar entre os estágios de maturação, e na média geral, não apresentou diferença significativa entre as cultivares. Pelo método ABTS, os frutos verdes apresentaram maior atividade antioxidante, e a AAT teve correlação positiva com o teor de CFT para os três estágios de maturação. Considerando a média geral, a cultivar 'Xavante' apresenta maior teor de CFT entre as cultivares estudadas, e não apresentou diferença significativa entre os estágios de maturação. O extrato de amora da cultivar 'Xavante' no estágio maduro, não apresentou citotoxicidade, aumentou a viabilidade celular e nas concentrações de 25, 50 e 100ug/mL não apresentaram danos oxidativos às células e as concentrações 25, 100 e 250ug/mL reduziram significativamente a atividade da MPO. De acordo com o disposto acima, a amora-preta da cultivar 'Xavante' no estágio maduro apresenta potencial para uso terapêutico, sugerindo-se mais estudos *in vivo* relacionados com o estresse oxidativo.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Berry*. Amoreira-preta. Compostos bioativos. Nutraceutica.

## ABSTRACT

Fruit consumption has increased globally against the proven benefits of its regular intake of health promotion. In this perspective, the world scenario is of growth in the market for blackberry mainly due to the health benefits of its photochemical qualities. Thus, the objective of this study was to characterize the bioactive compounds and to test the antioxidant activity in vitro of blackberry of different cultivars and stages of maturation. We used spectrophotometric methods and high performance liquid chromatography (HPLC) for the characterization of the compounds and the DPPH and ABTS methods for Total Antioxidant Activity (AAT), as well as cell viability (MTT) and cytotoxicity tests (nitric oxide and myeloperoxidase (MPO)). The chromatographic method used in this study was validated and from the individual flavonoid analyzes quercetin was the main aglycone found for all cultivars of blackberry. Using spectrophotometric methods, it was possible to verify that each blackberry cultivar has a different behavior regarding the content of total phenolic compounds (CFT), anthocyanins and flavonoids between the studied stages of maturation. The AAT, by the DPPH method, presented a distinct behavior for each cultivar between the stages of maturation, and in the general average, did not present significant difference among the cultivars. By the ABTS method, the unripe fruits presented higher antioxidant activity, and the AAT had a positive correlation with the CFT content for the three stages of maturation. Considering the general average, the 'Xavante' cultivar has a higher CFT content among the studied cultivars, and did not present a significant difference between the maturation stages. The ripe 'Xavante' cultivar blackberry extract showed no cytotoxicity, increased cell viability, and at concentrations of 25, 50 and 100 ug / ml showed no oxidative damage to the cells and the concentrations 25, 100 and 250 ug / ml significantly reduced the MPO activity. According to the above, the blackberry of the cultivar 'Xavante' at the mature stage presents potential for therapeutic use, suggesting further in vivo studies related to oxidative stress.

**KEYWORDS:** Berry. Blackberry. Bioactive compounds. Food analysis.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O consumo de frutas aumentou globalmente devido aos benefícios comprovados de sua ingestão regular na promoção da saúde e combate a distúrbios metabólicos e doenças crônicas como o câncer, diabetes mellitus, hipertensão, doenças cardiovasculares, doenças gastrointestinais, aterosclerose, envelhecimento, Parkinson e Alzheimer. Os benefícios para a saúde do consumo de frutas e seus derivados tem sido atribuído a presença de vários componentes bioativos e antioxidantes e seus efeitos sinérgicos (ZIA-UL-HAQ et al., 2014).

Nesta perspectiva, o cenário mundial é de crescimento no mercado para amora-preta devido a fatores econômicos e sociais, e aos benefícios que a amora-preta traz a saúde por suas qualidades fotoquímicas (ANTUNES et al., 2014). As amoras-pretas produzidas no Brasil apresentam elevado potencial antioxidante, principalmente pelos teores representativos de compostos fenólicos totais, flavonoides e o alto teor de antocianinas, com destaque para o conteúdo da antocianina cianidina 3-glucosídeo (FERREIRA; ROSSO; MERCADANTE, 2010).

O conteúdo de compostos bioativos nas frutas pode sofrer influência de vários fatores, como por exemplo fatores edafoclimáticos e/ou genéticos. Mas, o estágio de maturação dos frutos pode ser um dos fatores de maior influência no teor destes compostos (CANUTO et al., 2010).

Os resultados de estudos sobre o conteúdo de compostos bioativos em *berries* brasileiros são importantes para o melhoramento e seleção de cultivares com propriedades antioxidantes o que é de grande interesse para a indústria de alimentos frescos e processados, bem como para a indústria farmacêutica (SEGANTINI et al., 2015). A necessidade de mais trabalhos na identificação, quantificação e decifração dos constituintes bioativos de frutas também se dá pela necessidade de explorar o impacto desses na saúde humana, através de ensaios para validar as suas alegações nutracêuticas (ZIA-UL-HAQ et al., 2014).

Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar os compostos bioativos e testar a atividade antioxidante *in vitro* em amora-preta de diferentes cultivares e estágios de maturação.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

As amoras foram adquiridas do pomar de fruticultura da Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Chapecó, que está situado a uma latitude de 27°07'11"S, longitude de 52°42'30"O e a

uma altitude de 605 metros em relação ao nível médio dos mares. O clima do local, segundo a classificação de Köppen, é de categoria C, subtipo Cfa (Clima Subtropical úmido), com inverno frio e úmido e verão moderado e seco. O solo é denominado Latossolo Vermelho Distroférico (EMBRAPA, 2004).

A colheita das amoras foi realizada de setembro de 2016 a janeiro de 2017 (safra 2016), com exceção da cultivar ‘Xavante’, cuja a colheita foi realizada de setembro a dezembro de 2017 (safra 2017). Na colheita das frutas foi adotado um plano de amostragem sistemático por cultivar e estágio de maturação, sempre no período da manhã, onde estas foram higienizadas (lavadas, cloradas (200ppm) por pelo menos 15 minutos e enxaguadas), acondicionadas em sacos plásticos e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. As unidades experimentais por cultivar e estágio de maturação foram compostas por 150g de frutas cada, ou seja, em torno de 500g de frutas colhidas por cultivar e estágio de maturação. As análises de caracterização dos compostos e da atividade antioxidante foram realizadas em triplicata.

Quatro cultivares de amoreira-preta foram colhidas (‘Cherokee’, ‘Guarani’, ‘Tupy’ e ‘Xavante’) em três estágios de maturação segundo Hussain et al. (2016), com modificações (figura 5).



A)

B)

C)

Figura 5. Estágios de maturação de amora: A) Baga verde B) Baga semi-madura C) Baga madura.

Fonte: Autores, 2018.

### 3.2.1 EXTRAÇÃO

A metodologia de extração dos compostos bioativos da amora foi adaptada de Milivojevic, et al. (2013). Cinco gramas de fruta foram homogeneizados com 20mL de solução extratora composta por metanol/ $\text{H}_2\text{O}$ / $\text{HCl}$  (70:30:5 proporção por volume) durante um minuto. Em seguida, o homogeneizado foi filtrado em papel filtro e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. O

extrato foi utilizado para as análises de flavonoides individuais por CLAE-DAD, de Compostos Fenólicos Totais e análises do cultivo celular (MTT, óxido nítrico, mieloperoxidase).

### 3.2.2 FLAVONOIDES INDIVIDUAIS (CLAE-DAD)

#### 3.2.2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

A extração dos compostos foi como descrita anteriormente no item 3.2.1, no entanto, após testes prévios foi necessária a hidrólise dos extratos brutos. A hidrólise foi realizada pela técnica de refluxo, onde em um balão fechado conectado a um condensador os extratos foram aquecidos em manta de aquecimento a  $85^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  por 2h. Os extratos foram armazenados em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise e então filtrados em filtros de  $0,45\mu\text{m}$  PTFE-45/25 em vials de 2mL para CLAE.

#### 3.2.2.2 CONDIÇÕES DO CROMATÓGRAFO

Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu conectado a um detector DAD (Diodo Array Detector) SPD – M20A Shimadzu e a temperatura do detector foi de  $30^{\circ}\text{C}$ . A coluna utilizada foi C18 NST – 18 ( $4,6\text{mm} \times 250\text{mm} \times 5\mu\text{L}$ ), e a temperatura do forno foi de  $30^{\circ}\text{C}$ . Foram utilizadas duas fases móveis, A=ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 0,1% e B=acetonitrila, no fluxo de  $0,5\text{mL min}^{-1}$  com o seguinte sistema gradiente de eluição: nos primeiros 40 min. de 5% a 40% B, seguido de 5 min. reverso para 5% B. O volume de injeção da amostra foi de  $20\mu\text{L}$ . O tempo de execução de cada corrida foi de 50min. A leitura foi realizada em  $\lambda=370$  nm. Os padrões utilizados para as análises foram miricetina, quercetina e kaempferol SIGMA.

#### 3.2.2.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A linearidade foi obtida utilizando sete diferentes concentrações (0,50; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e  $20,0 \text{mg.L}^{-1}$ ) obtidas a partir de soluções padrão de  $50 \text{mg.L}^{-1}$  de miricetina, quercetina e kaempferol. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados conforme os cálculos abaixo:

$$\text{LOD} = (3.3 \times \text{DP})/\text{IC}$$

$$\text{LOQ} = (10 \times \text{DP})/\text{IC}$$

onde:

DP = desvio padrão do intercepto da curva de regressão

IC = inclinação da curva analítica

A repetibilidade foi avaliada a partir da faixa de trabalho, onde o primeiro ponto, o ponto médio e o ponto mais alto (0,5, 10 e 20 mg.L<sup>-1</sup>) de cada padrão foi analisado cinco vezes no mesmo dia para determinação da concentração em função da área do pico. Para a precisão intermediária, o primeiro ponto, o ponto médio e o ponto mais alto (0,5, 10 e 20 mg.L<sup>-1</sup>) de cada padrão foi analisado em três dias consecutivos. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (%DPR). A exatidão foi determinada para as mesmas amostras como o erro relativo (%ER) entre as médias das concentrações calculadas e as concentrações nominais. E a recuperação foi avaliada contaminando-se a amostra com soluções de padrão analítico de interesse de concentração conhecida e expressa em percentuais (%).

### 3.2.3 ANTOCIANINAS E FLAVONOIDES TOTAIS

A extração e quantificação de antocianinas e flavonoides totais foi conforme metodologia de Lees; Francis (1972), com algumas modificações. Onde, 5g de fruta foram triturados com 100mL de solução extratora composta por metanol/HCl (85:15 proporção por volume) e armazenado em temperatura ambiente ao abrigo de luz por 20h. Após as 20h, o extrato foi filtrado e lavado com 25mL da solução extratora e deixado em repouso ao abrigo de luz por 2h. Então, retirou-se 1mL da amostra e adicionou-se mais 10mL da solução extratora e agitou-se em vórtex antes da leitura. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro em  $\lambda=374\text{nm}$  para flavonóides e em  $\lambda=535\text{nm}$  para antocianinas.

Para os cálculos foram utilizadas as seguintes equações:

- Flavonoides: (Valor da absorbância x Fator de diluição) / 76,6
- Antocianinas: (Valor da absorbância x Fator de diluição) / 98,2

Onde: Fator de diluição =  $\frac{\text{quantidade de solução extratora utilizada na maceração e na filtração}}{\text{quantidade de extrato vegetal utilizado pra compor a amostra}} \times \text{quantidade de solução extratora adicionada a amostra final utilizada}$ . Os resultados foram expressos em miligramas por grama de amostra (mg/g).

### 3.2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

A quantificação dos CFT ocorreu pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton; Rossi JR. (1965) e modificado por Georgé et al. (2005). Onde, 0,5mL do extrato descrito no item 3.2.1 com 2,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu foram deixados em repouso por cinco minutos a temperatura ambiente e adicionados 2,0mL de carbonato de sódio 4% e incubados a temperatura ambiente, no escuro, por duas horas. Então realizada a leitura em espectrofotômetro em  $\lambda=760\text{nm}$ . Utilizou-se ácido gálico (AG) como um padrão para a curva de calibração, a qual foi construída nas concentrações de 2,5; 5; 10; 25; 50; 75; 100 e 120ppm de AG. Os resultados foram expressos em miligramas de EAG (EAG = equivalente de ácido gálico) por grama de amostra (mg EAG/g).

### 3.2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL ATRAVÉS DO MÉTODO ABTS

A atividade antioxidante total foi avaliada através da capacidade antioxidante de equivalentes de trolox (TEAC), método que mede a capacidade da amostra em extinguir o radical livre  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  em ambientes lipofílicos e hidrofílicos segundo Rufino et al. (2007). Homogeneizou-se 5g de fruta com 40 mL de metanol 50% e deixou-se em repouso por 1h em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 4500 rpm por 15 minutos e separou-se o sobrenadante. Então, foi adicionado 40 mL de acetona 70% a amostra residual do tubo de centrifugação que também foi homogeneizada e deixada em repouso por 1h à temperatura ambiente, centrifugada novamente a 15000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi adicionado ao sobrenadante da primeira centrifugação e completado volume até 100 mL com água destilada em um balão volumétrico, e assim obtido o extrato.

A partir do extrato foi preparado três diluições (25, 50 e 100%). Uma alíquota de 30  $\mu\text{L}$  de cada diluição do extrato foi adicionada a 3,0 mL do radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  e a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a  $\lambda=734\text{nm}$  após 6 minutos da mistura. O metanol foi utilizado como branco para calibrar o equipamento. Para o cálculo da AAT foi substituído na equação da reta, gerada a partir das diferentes concentrações do extrato, a absorbância correspondente a 1000  $\mu\text{M}$  de trolox. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  trolox /g de amostra.

### 3.2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL ATRAVÉS DO MÉTODO DPPH

A atividade antioxidante total também foi avaliada através do princípio da captura do radical livre DPPH por antioxidantes, com base na metodologia proposta por Rufino et al. (2007b). O extrato foi realizado da mesma maneira descrita anteriormente para o ensaio ABTS.

A partir do extrato foram realizadas três diluições (25, 50 e 100%) para o cálculo da concentração do composto e determinação do efeito em 50% - EC<sub>50</sub>. Uma alíquota de 0,1 mL de cada amostra foi adicionada em 3,9 mL de solução 0,06 mM do radical DPPH e a sua absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a  $\lambda=515\text{nm}$  até estabilização ( $\pm 11$  minutos). Para calibrar o equipamento foi utilizado como branco o metanol e como controle uma solução de metanol, acetona e água. Os dados obtidos foram confrontados com a curva padrão do DPPH, elaborada através da leitura de diferentes diluições do radical. Os resultados foram expressos em gramas de fruto/gramas de DPPH.

### 3.2.7 CULTIVO CELULAR

No cultivo celular foram utilizadas as células polimorfonucleares do sangue. Sangue humano foi coletado e as células extraídas e mantidas em cultivo. As células foram contadas em microscópio óptico e a concentração de  $1 \times 10^8$  cultivada em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e antifúngico, e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C.

O extrato de amora descrito no item 3.2.1 foi rotaevaporado, liofilizado e posteriormente diluído em água. Após 24 horas de adaptação na placa de cultivo, as células foram tratadas com diferentes concentrações (0, 25, 50, 100, 250 e 500ug/mL) deste extrato. As células ficaram expostas ao extrato de amora por 24 horas e então foram realizadas as análises de viabilidade celular, produção de óxido nítrico e mieloperoxidase.

### 3.2.8 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT 3-(4, 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, segundo Fukui; Yamabe; Zhu (2010). As células foram cultivadas em placas de 96 poços e coradas com 10 $\mu\text{L}$  do reagente de MTT e 90 $\mu\text{L}$  de solução salina tamponada com fosfato (PBS) durante 1 h a 37°C. Então, centrifugou-se por 10 minutos a 2000rpm, retirou-se e descartou-se 70 $\mu\text{L}$  do sobrenadante e adicionou-se 70 $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO),

e a absorvância foi medida a  $\lambda = 560$  nm. Os resultados foram expressos em percentual, comparando-se a percentagem da absorvância com a percentagem do controle negativo.

$$\text{Absorvância \%} = (\text{Absorvância} \times 100) / \text{médica do controle negativo}$$

### 3.2.9 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (ON)

Níveis de óxido nítrico foram estimados medindo a concentração de nitritos ( $\text{NO}_2$ ), o produto final estável do metabolismo de óxido nítrico, em meios de cultura com o reagente de Griess. Em uma placa, foi colocado 100 $\mu\text{l}$  do sobrenadante e adicionado 100 $\mu\text{l}$  do reagente de Griess, incubado por 10min em temperatura ambiente e realizada a leitura em  $\lambda = 540\text{nm}$  (NOH et al., 2015). Os resultados foram expressos em percentual, comparando-se a percentagem da absorvância com a percentagem do controle negativo.

$$\text{Absorvância \%} = (\text{Absorvância} \times 100) / \text{médica do controle negativo}$$

### 3.2.10 MIELOPEROXIDASE (MPO)

Os níveis de MPO foram avaliados segundo Suzuki et al. (1983). Em uma placa foi pipetado 12 $\mu\text{l}$  de sobrenadante e adicionado 148 $\mu\text{l}$  de aminoantipirina 25mM, mais 170  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,7mM e incubado 30 min a 37°C. Na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente oxidante, a MPO catalisa o acoplamento oxidativo de fenol e aminoantipirina originando um produto colorido, a quinoneimina, com uma absorvância máxima de  $\lambda = 500\text{nm}$ . Assim, a leitura foi realizada em  $\lambda = 492\text{nm}$ . Os resultados foram expressos em percentual, comparando-se a percentagem da absorvância com a percentagem do controle negativo.

$$\text{Absorvância \%} = (\text{Absorvância} \times 100) / \text{médica do controle negativo}$$

### 3.2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro Wilk. A análise de variância (ANOVA) utilizada para avaliar a influência das diferentes cultivares e dos estágios de maturação no teor de compostos bioativos e na atividade antioxidante das frutas. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O programa utilizado foi Sisvar 5.6. Também foi realizada a correlação entre o teor dos diferentes compostos analisado com a AAT, o teste utilizado foi Spearman`s Rho e o programa JMP 5.1.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A confiabilidade do método de CLAE utilizado neste trabalho foi comprovado verificando sua linearidade, limite de detecção e de quantificação, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e recuperação segundo a ICH (2005).

As equações de regressão tomaram a forma  $Y = aX + b$ , onde: o eixo Y é o valor da área do pico cromatográfico (mAU) e o eixo X é o peso do componente marcador ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). As equações de regressão de miricetina, quercetina e kaempferol e os parâmetros de linearidade são apresentados na tabela 1. Os altos coeficientes de determinação das faixas lineares de cada padrão indicam linearidade no intervalo sob investigação.

O limite de detecção (LOD) corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato. Na prática, LOD é determinado como a menor concentração do analito que pode ser diferenciado do ruído. E o limite de quantificação (LOQ), corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada (LANÇAS, 2004). O LOD e o LOQ podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Faixa linear, equação de regressão, coeficiente de determinação e limite de determinação e quantificação para Miricetina, Quercetina e Kaempferol.

Composto	Faixa linear ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Equação	$R^2$	LOD ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Miricetina	0,5 – 20	$y = 149059,9388x - 14730,2839$	0,9988	0,0586	0,1775
Quercetina	0,5 – 20	$y = 162010,9548x - 17797,0750$	0,9990	0,0414	0,1256
Kaempferol	0,5 – 20	$y = 158185,2256x - 20517,1249$	0,9990	0,0710	0,2153

A repetibilidade expressa a fidelidade obtida nas mesmas condições operacionais (mesmo dia, mesmo equipamento, etc.) empregados em um curto intervalo de tempo (LANÇAS, 2004). Os desvios padrão relativos das amostras não passaram de 10,06%, conforme mostrado na tabela 2.

Tabela 2. Concentração média, desvio padrão e desvio padrão relativo de cinco repetições de miricetina, quercetina e kaempferol.

Padrão ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Concentração média ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	DP	DPR (%)
Miricetina			
0,5	0,5072	0,0510	10,06
10	10,1078	0,4646	4,60

20	19,7465	1,0130	5,13
<i>Quercetina</i>			
0,5	0,5667	0,0123	2,18
10	10,0643	0,2330	2,32
20	19,7677	0,6650	3,36
<i>Kaempferol</i>			
0,5	0,5716	0,0213	3,73
10	10,2020	0,2211	2,17
20	20,1481	0,6273	3,11

A precisão é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2004). Na avaliação da precisão intermediária, os desvios padrões relativos das amostras não foram maiores que 6,50%, tabela 3.

Enquanto a precisão mede o quão bem os resultados obtidos se assemelham entre si, a exatidão mede o quanto o valor obtido se assemelha ao valor tido como verdadeiro (LANÇAS, 2004). Os erros relativos das amostras não passaram de 14,04%, como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3. Concentração média, desvio padrão, desvio padrão relativo e erro relativo das análises de miricetina, quercetina e kaempferol realizadas em três dias consecutivos.

<i>Padrão (mg.L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Concentração média (mg.L<sup>-1</sup>)</i>	<i>DP</i>	<i>DPR (%)</i>	<i>ER (%)</i>
<i>Miricetina</i>				
0,5	0,5280	0,0343	6,50	2,72
10	10,1485	0,2019	1,99	1,89
20	19,7996	0,8302	4,19	-2,18
<i>Quercetina</i>				
0,5	0,5645	0,0205	3,63	13,35
10	10,0778	0,0575	0,57	1,18
20	20,1547	0,3121	1,55	1,18
<i>Kaempferol</i>				
0,5	0,5770	0,0073	1,27	14,04
10	10,2700	0,0285	0,28	1,48
20	20,1914	0,6571	3,25	-0,24

A recuperação é uma medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz a qual se encontra presente (LANÇAS, 2004). Os percentuais de recuperação foram de 73,8% a 108,6%, tabela 4. A recuperação foi satisfatória segundo ICH que considera a faixa de recuperação entre 70% a 120% para a maioria dos procedimentos analíticos.

Tabela 4. Percentuais de recuperação de mirecetina, quercetina e kaempferol em amora e framboesa.

<i>Amostras</i>	<i>Mirecetina</i>	<i>Quercetina</i>	<i>Kaempferol</i>
<i>Fallgoald verde hidrolizado</i>	73,8%	94%	96,9%
<i>Heritage verde hidrolizado</i>	88,7%	98,3%	103,1%
<i>Xavante semi-maduro hidrolizado</i>	94%	74,9%	108,6%
<i>Padrão 10mg</i>	92,8%	99,7%	98,9%

A partir da análise dos cromatogramas gerados pela CLAE-DAD, verificou-se que a aglicona principal para as quatro cultivares de amora estudadas é a quercetina. Podemos observar nas figuras 4) ‘Cherokee’ (Anexo A), 5) ‘Guarani’ (Anexo B), 6) ‘Tupy’ (Anexo C) e 7) ‘Xavante’ (Anexo C) o mesmo comportamento quanto aos cromatogramas das amostras hidrolisadas (d), e) e f)) em relação aos cromatogramas das amostras brutas (a), b) e c)), respectivamente para cada cultivar. O pico em 40 minutos, referente a quercetina, aumentou nas amostras hidrolisadas em comparação com o mesmo pico nas amostras brutas dos extratos de amora.

O pico no tempo 45,9 minutos, que pode ser referente a kaempferol, também obteve um pequeno aumento nas amostras hidrolisadas, figuras 4, 5, 6 e 7 e), f) e g) (Anexo A, B, C e D). Ainda, em algumas amostras, após a hidrólise, no tempo de retenção 34 minutos, surgiu um pico de menor intensidade que pode ser miricetina, figura 6) d), e) e f) (Anexo C) e figura 7) e) e f) (Anexo D). Essas duas substâncias possivelmente estão presentes em quantidades muito pequenas nas amostras analisadas, havendo a necessidade de confirmar a identidade e quantidade utilizando outros métodos/equipamentos, como por exemplo utilizando cromatografia líquida com espectrômetro de massas (LC-MS). Assim, não é possível quantificar com exatidão pelo método utilizado neste trabalho substâncias presentes nas amostras em quantidades inferiores a 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, por estar abaixo da nossa faixa de trabalho.

A hidrólise ocorreu no pico em 26 minutos, onde a quercetina apresentava-se glicosilada, figuras 4, 5, 6 e 7 a) b) e c) (Anexo A, B, C e D), e a aglicona foi transferida para o pico em 40 minutos figuras 4, 5, 6 e 7 d) e) e f) (Anexo A, B, C e D). Nos cromatogramas da figura 4 b) (Anexo

A) em relação a 4 e) (Anexo A) percebe-se que a hidrólise do pico em 26 minutos não foi completa. O pico em 28 minutos separou depois de hidrolizado, o qual pode ser a separação de um grupo de açúcares da quercetina. A aglicona também foi transferida para o pico em 40 minutos. A retenção de compostos acontece do hidrofílico para o lipofílico, devido a isso as agliconas, que perderam açúcares, substâncias higroscópicas, aparecem mais tarde em comparação as substâncias glicosiladas.

Também podemos observar o mesmo comportamento para as quatro cultivares ao longo dos estágios de maturação, figuras 4, 5, 6 e 7 a) verde b) semi-maduro e c) maduro (Anexo A, B, C e D). Há um aumento do pico no tempo de 18 a 20, ou seja, há formação de antocianinas conforme o fruto amadurece. As antocianinas não foram afetadas pela hidrólise e os picos de 18 a 20 permanecem iguais nas figuras 4, 5, 6 e 7 c) e f) (Anexo A, B, C e D).

A concentração de quercetina nas amostras após hidrólise foi menor em ‘Tupy’ no estágio de maturação semi-maduro e maior em ‘Xavante’ no estágio verde (tabela 5). Hirsch (2011) avaliou diferentes genótipos de amoreira-preta no estágio maduro e a quantidade de quercetina variou de 1,7 a 6,0 mg.100g<sup>-1</sup>. Entre as cultivares, ‘Guarani’ apresentou o teor mais alto de quercetina (6,0 ± 0,3 mg.100g<sup>-1</sup>), ‘Tupy’ (3,9±01 mg.100g<sup>-1</sup>) intermediário e Cherokee 2,6 ± 0,3 mg.100g<sup>-1</sup> o menor teor. Diferente do presente estudo em que, no estágio maduro, o teor de quercetina foi maior em ‘Cherokee’ seguido de ‘Xavante’, ‘Guarani’ e a cultivar ‘Tupy’ apresentou o menor teor (tabela 5).

Tabela 5. Concentração média de quercetina e desvio padrão de diferentes amostras hidrolizadas de amora em diferentes estágios de maturação.

<i>Cultivar</i>	<i>Concentração média (mg.L<sup>-1</sup>)</i>	<i>DP</i>
<i>Cherokee verde</i>	10,72	0,17
<i>Cherokee semi-maduro</i>	6,99	0,12
<i>Cherokee maduro</i>	15,74	0,15
<i>Guarani verde</i>	13,97	0,14
<i>Guarani semi-maduro</i>	7,91	0,12
<i>Guarani maduro</i>	9,48	0,14
<i>Tupy verde</i>	6,68	0,11
<i>Tupy semi-maduro</i>	4,05	0,14
<i>Tupy maduro</i>	8,01	0,13
<i>Xavante verde</i>	21,12	0,16
<i>Xavante semi-maduro</i>	10,95	0,18

*Xavante maduro*

13,10

0,14

Em relação ao teor de flavonoides totais, tabela 6, para as cultivares ‘Cherokee’ e ‘Guarani’ os maiores teores estão no fruto verde. Já as cultivares ‘Tupy’ e ‘Xavante’ apresentam os menores teores de flavonoides no estágio verde, não diferindo entre os estágios de maturação semi-maduro e maduro. Em todas as cultivares estudadas, as amoras no estágio de maturação maduro apresentaram o maior teor de antocianinas comparadas as amoras nos estágios semi-maduro e verde (tabela 6).

Os teores de flavonoides e antocianinas totais encontrados neste estudo, são semelhantes aos encontrados em outros estudos utilizando o mesmo método de quantificação, Lees e Francis (1972), tanto para amora-preta quanto para outras frutas como jabuticaba, acerola e pitanga, também fontes de compostos antioxidantes. Oliveira et al. (2013) avaliaram amora-preta da cultivar ‘Tupy’ no estágio de maturação maduro, produzidas em sistema orgânico na cidade de Palmas/PR, e encontrou teor de antocianinas de 15,68 mg.100g<sup>-1</sup>MF para amoras da safra 2008 e 71,99 mg.100g<sup>-1</sup>MF para amoras da safra 2009. Neste estudo, a cultivar ‘Tupy’ no estágio maduro apresentou teor de antocianinas intermediário aos encontrados por Oliveira et al. (2013), sendo 40,03 mg.100g<sup>-1</sup>MF (tabela 6).

Em polpa de pitanga madura, De Lima; Mélo; Lima (2002), encontraram teor de 26 mg.100g<sup>-1</sup>MF antocianinas e de 18 mg.100g<sup>-1</sup>MF flavonoides. Lima et al. (2011) avaliaram o teor de antocianinas em duas variedades de jabuticabas maduras e encontraram diferença significativa entre as variedades, sendo o teor de antocianinas de 15,85 mg.100g<sup>-1</sup>MF para a variedade Paulista e de 20,57 mg.100g<sup>-1</sup>MF para a variedade Sabará. De Lima et al. (2000) avaliaram diferentes seleções de acerola e os teores de antocianinas variaram entre 14,06 mg.100g<sup>-1</sup>MF para ‘Coopama’ e 50,98 mg.100g<sup>-1</sup>MF para ‘Inada’, e os teores de flavonoides variaram de 10,21 mg.100g<sup>-1</sup>MF ‘Coopama’ e 20,22 mg.100g<sup>-1</sup>MF ‘Inada’. No presente estudo, o teor de antocianinas das cultivares de amoras maduras variou de 14,19 mg.100g<sup>-1</sup>MF ‘Cherokee’ a 46,27 mg.100g<sup>-1</sup>MF ‘Guarani’ apresentando diferença significativa entre todas as cultivares e o teor de flavonoides variou de 16,15 ‘Cherokee’ a 24,64 ‘Xavante’ (tabela 6).

Antocianinas são compostos naturais que transmitem cor a frutas, legumes e plantas. Além de dar coloração aos vegetais, as antocianinas são antioxidantes, trazem vários benefícios à saúde agindo como quelantes de íons metálicos e eliminando os radicais hidroxila e os radicais ânion superóxido (KONG et al., 2003).

Os flavonoides também são pigmentos naturais presentes nos vegetais, e são antioxidantes por serem doadores de elétrons. Apresentam estruturas químicas conjugadas em anel, ricas em

grupos hidroxilas, que tem potenciais ações antioxidantes por reagirem e inativarem ânions superóxido, oxigênio singlete, radicais peróxido de lipídios e/ou estabilizando radicais livres envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes (MACHADO et al., 2008).

Tabela 6- Conteúdo de Flavonoides, Antocianinas, CFT e Atividade antioxidante total de amora em diferentes cultivares e estágios de maturação.

<i>Cultivar</i>	<i>Verde</i>	<i>Semi-maduro</i>	<i>Maduro</i>	<i>Média geral</i>
<i>Flavonoides totais(mg.100g<sup>-1</sup>MF)</i>				
<i>Cherokee</i>	42,86 ± 5,86cB	16,75 ± 3,60bA	16,15 ± 1,96aA	25,26 ± 13,68ab
<i>Guarani</i>	55,48 ± 3,47dC	6,45 ± 0,73aA	20,72 ± 1,30abB	27,55 ± 21,92c
<i>Tupy</i>	7,67 ± 4,73aA	14,28 ± 1,22bB	18,87 ± 3,49abB	13,61 ± 5,73a
<i>Xavante</i>	17,71 ± 1,71bA	24,53 ± 3,78cB	24,64 ± 0,71bB	22,29 ± 4,03b
<i>Média geral</i>	30,93 ± 20,29C	15,50 ± 7,12A	20,10 ± 3,70B	
<i>Antocianinas totais (mg.100g<sup>-1</sup>MF)</i>				
<i>Cherokee</i>	2,33 ± 0,37abA	1,95 ± 0,32aA	14,19 ± 1,97aB	6,16 ± 6,11a
<i>Guarani</i>	4,79 ± 0,26bA	3,18 ± 0,38abA	46,27 ± 3,25dB	18,08 ± 21,22d
<i>Tupy</i>	0,51 ± 0,25aA	4,92 ± 0,45bB	40,03 ± 0,44cC	15,15 ± 18,76c
<i>Xavante</i>	1,65 ± 0,58aA	3,95 ± 0,64abA	17,99 ± 0,75bB	7,86 ± 7,68b
<i>Média geral</i>	2,32 ± 1,67 <sup>a</sup>	3,50 ± 1,20A	29,62 ± 14,48B	
<i>CFT (mg EAG/g)</i>				
<i>Cherokee</i>	1,42 ± 0,05bB	1,18 ± 0,05bA	1,38 ± 0,01abB	1,33 ± 0,13a
<i>Guarani</i>	1,08 ± 0,00aA	1,37 ± 0,04cB	1,40 ± 0,02abB	1,28 ± 0,15a
<i>Tupy</i>	1,49 ± 0,03bC	1,02 ± 0,08aA	1,32 ± 0,01aB	1,28 ± 0,21a
<i>Xavante</i>	1,52 ± 0,03bA	1,45 ± 0,02cA	1,47 ± 0,09bA	1,48 ± 0,06b
<i>Média geral</i>	1,38 ± 0,19B	1,25 ± 0,18A	1,39 ± 0,07B	
<i>AAT - DPPH (EC<sub>50</sub> g de fruta g<sup>-1</sup> DPPH)</i>				
<i>Cherokee</i>	38,24 ± 9,45abAB	29,33 ± 3,20aA	43,31 ± 2,97bB	36,96 ± 8,04a
<i>Guarani</i>	45,96 ± 1,07bB	24,81 ± 5,22aA	30,03 ± 6,30aA	33,60 ± 10,40a
<i>Tupy</i>	28,49 ± 12,94aA	31,41 ± 2,10aA	29,52 ± 3,86aA	29,80 ± 6,95a
<i>Xavante</i>	43,55 ± 2,48bB	33,29 ± 2,26aAB	25,50 ± 1,21aA	34,11 ± 8,04a
<i>Média geral</i>	39,06 ± 9,86B	29,71 ± 4,41A	32,09 ± 7,81A	
<i>AAT - ABTS (µM trolox g<sup>-1</sup> amostra)</i>				
<i>Cherokee</i>	21235,63 ± 919,81aB	9668,64 ± 232,74aA	10316,68 ± 920,52aA	13740,32 ± 5667,16a
<i>Guarani</i>	-----	14611,18 ± 294,81aA	13305,36 ± 3205,55aA	13958,27 ± 2157,90a
<i>Tupy</i>	31499,99 ± 7679,48bB	8511,66 ± 862,27aA	8031,13 ± 1968,73aA	16014,26 ± 12281,43a
<i>Xavante</i>	30101,14 ± 3785,29bB	24058,82 ± 2296,60bB	12555,50 ± 860,76aA	22238,48 ± 8041,86b
<i>Média geral</i>	27612,25 ± 6463,44B	14212,57 ± 6488,33A	11052,17 ± 2738,49A	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto ao teor de CFT, cada cultivar apresentou um comportamento distinto entre os estágios de maturação estudados (tabela 6). Na cultivar ‘Cherokee’ os estágios verde e maduro apresentaram maiores teores de CFT que o estágio semi-maduro. Para a cultivar ‘Guarani’ os estágios semi-maduro e maduro obtiveram maiores teores de CFT que o estágio verde. Já na ‘Tupy’, o estágio verde apresentou maior teor de CFT que o estágio maduro e este maior teor que o estágio semi-maduro. E a ‘Xavante’ não apresentou diferença significativa no teor de CFT entre os estágios de maturação.

Milivojevic et al., 2013 comparou o teor de compostos bioativos e a capacidade antioxidante de diversos *berries* no estágio maduro, utilizando a mesma metodologia desse estudo, de Singleton; Rossi (1965), para CFT. A cultivar de amora ‘Thornfree’ apresentou teor de CFT de 1,97 mg EAG g<sup>-1</sup>, a ‘Cacanska bestrna’ 1,74 mg EAG g<sup>-1</sup> e a ‘R. Plicatus’ 3,20 mg EAG g<sup>-1</sup>, um híbrido de cultivares nativas da Serbia, a qual apresentou teor superior ao das duas primeiras cultivares. Neste estudo, considerando apenas o estágio maduro, a cultivar ‘Xavante’ (1,47 mg EAG g<sup>-1</sup>) apresentou teores superior a ‘Tupy’ (1,32 mg EAG g<sup>-1</sup>) e as demais cultivares ‘Cherokee’ e ‘Guarani’ apresentaram teores intermediários 1,38 e 1,40 mg EAG g<sup>-1</sup> respectivamente.

Azevedo (2011) avaliou o teor de CFT e de antocianinas de cinco diferentes estágios de maturação de amora-preta, mas apenas de uma cultivar (Tupy). Diferente do presente estudo, não foi encontrado diferença significativa entre os estágios de maturação quanto ao teor de CFT. Já o conteúdo de antocianinas aumentou juntamente com a progressão da maturação do fruto, ou seja, com teores aumentando do fruto verde para o maduro, o mesmo comportamento foi observado para a cultivar ‘Tupy’ (tabela 6). As antocianinas possuem papel fundamental como antioxidantes naturais na amora-preta, representando em torno de 65% da atividade antirradical livre dos compostos fenólicos totais (FERREIRA; ROSSO; MERCADANTE, 2010).

A comparação entre resultados de atividade antioxidante vem sendo relatada em outros estudos como inviável, devido às diferenças entre os métodos de análises e entre a apresentação dos resultados (GOLDONI, 2017; PACHECO, 2015). Então, neste trabalho não foi incluído os valores da literatura para a atividade antioxidante, assim como no estudo de De Souza et al. (2014), apenas foi comparado qualitativamente os resultados encontrados quanto a cultivares e estágios de maturação de frutos. Sugere-se uma padronização das metodologias, e dos cálculos de apresentação de resultados de atividade antioxidante, assim como dos métodos de quantificação dos compostos bioativos, pois a mesma dificuldade também foi encontrada para comparação dos resultados de CFT, antocianinas e flavonoides. Ou seja, há a necessidade da criação de um “padrão ouro” para análises em alimentos.

Quanto a AAT dos estágios de maturação, diferentes componentes da amostra podem ter apresentado maior afinidade de sequestrar o radical ABTS e outros mais eficientes para o radical DPPH. Sendo que, os frutos verdes apresentaram maior atividade antioxidante pelo método ABTS, exceto para a cultivar ‘Guarani’ onde as análises não foram realizadas neste estágio de maturação. Pelo método DPPH, houve um comportamento distinto para cada cultivar entre os estágios de maturação, salientando que, quanto menor o valor de  $EC_{50}$ , maior a atividade antioxidante do composto analisado. Onde, a cultivar ‘Cherokee’ obteve melhor AAT nos estágios verde e semi-maduro, a ‘Guarani’ nos estágios semi-maduro e maduro, na ‘Xavante’ os frutos no estágio maduro apresentaram melhor AAT que os frutos verdes. E a ‘Tupy’ não diferiu entre os estágios de maturação quanto a AAT (tabela 6).

Zielinsk et al. (2015) testaram a AAT de amoras das cultivares ‘Tupy’ e ‘Brazos’ pelo método FRAP, também em três estágios de maturação (verde, semi-maduro e maduro) e não encontrou diferença significativa entre os estágios de maturação. Hassimotto et al. (2008), avaliaram a AAT de cinco cultivares de amora-preta brasileiras pelo método de  $\beta$ -caroteno e não encontraram diferença significativa entre elas, porém todas as cultivares, incluindo ‘Tupy’ e ‘Guarani’ também avaliadas neste estudo, foram eficientes em inibir a oxidação do  $\beta$ -caroteno sendo caracterizadas como fortes antioxidantes.

Hirsch (2011) avaliou a AAT a partir de extratos antocianínicos de amora-preta pelo método DPPH, e não encontrou diferença entre as cultivares ‘Guarani’, ‘Tupy’ e ‘Cherokee’ colhidas no ano de 2007, apenas houve diferença quanto a cultivar ‘Xavante’ e ‘Cherokee’ colhidas no ano de 2009. O mesmo pode ser observado neste estudo, com o método ABTS, se considerarmos apenas a média geral das cultivares estudadas, onde a cultivar ‘Xavante’, colhida no ano de 2017, foi a única que apresentou diferença das demais cultivares, que foram colhidas em 2016 (tabela 6). Tal fato sugere que a diferença na AAT pode estar relacionada com os elementos climáticos de cada ano e não com a cultivar.

Guedes et al. (2014) analisaram diferentes cultivares de amora no estágio de maturação maduro pelo método DPPH, e a cultivar ‘Xavante’ apresentou melhor AAT seguido da ‘Guarani’ que não diferiu da ‘Cherokee’. A cultivar ‘Tupy’ obteve o pior desempenho quanto AAT. No presente estudo, analisando as cultivares no estágio maduro, apenas a ‘Cherokee’ diferiu das demais, apresentando a menor AAT pelo método DPPH (tabela 6).

A atividade antioxidante de amora-preta tem sido relacionada em outros estudos com o teor de CFT (FERREIRA; ROSSO; MERCADANTE, 2010; GUEDES et al., 2017; SILVA; VENDRUSCOLO; TORALLES, 2011). Nossos resultados demonstraram que a AAT, pelo método

ABTS, teve correlação positiva com o teor de CFT para os três estágios de maturação, verde  $r = 0,8452$ , semi-maduro  $r = 0,9580$  e maduro  $r = 0,6014$ . Na média geral, a cultivar ‘Xavante’ apresenta maior teor de CFT entre as cultivares estudadas, e não apresentou diferença significativa entre os estágios de maturação (tabela 6). Assim, as análises de viabilidade celular (figura 10), óxido nítrico (figura 11) e mieloperoxidase (figura 12) foram realizadas apenas com a cultivar ‘Xavante’ no estágio de maturação comercial, ou seja, maduro.

O efeito de diferentes concentrações de extrato de ‘Xavante’ foi testado, figura 10, e não apresentou citotoxicidade, havendo um aumento da viabilidade celular a partir da concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Chen et al. (2016) testaram o efeito protetor de amora-preta antes e após simulação de digestão gastrointestinal *in vitro* frente a indução de citotoxicidade por Etil carbamato (EC) em células Caco-2. A viabilidade celular observada caiu para 71,6% em comparação com o grupo controle (100%) após a indução da citotoxicidade por EC. A amora-preta antes da digestão exerceu uma fraca proteção (77,25% da viabilidade celular), enquanto que depois da digestão proporcionou uma potente proteção aumentando a viabilidade celular para 94,5%.

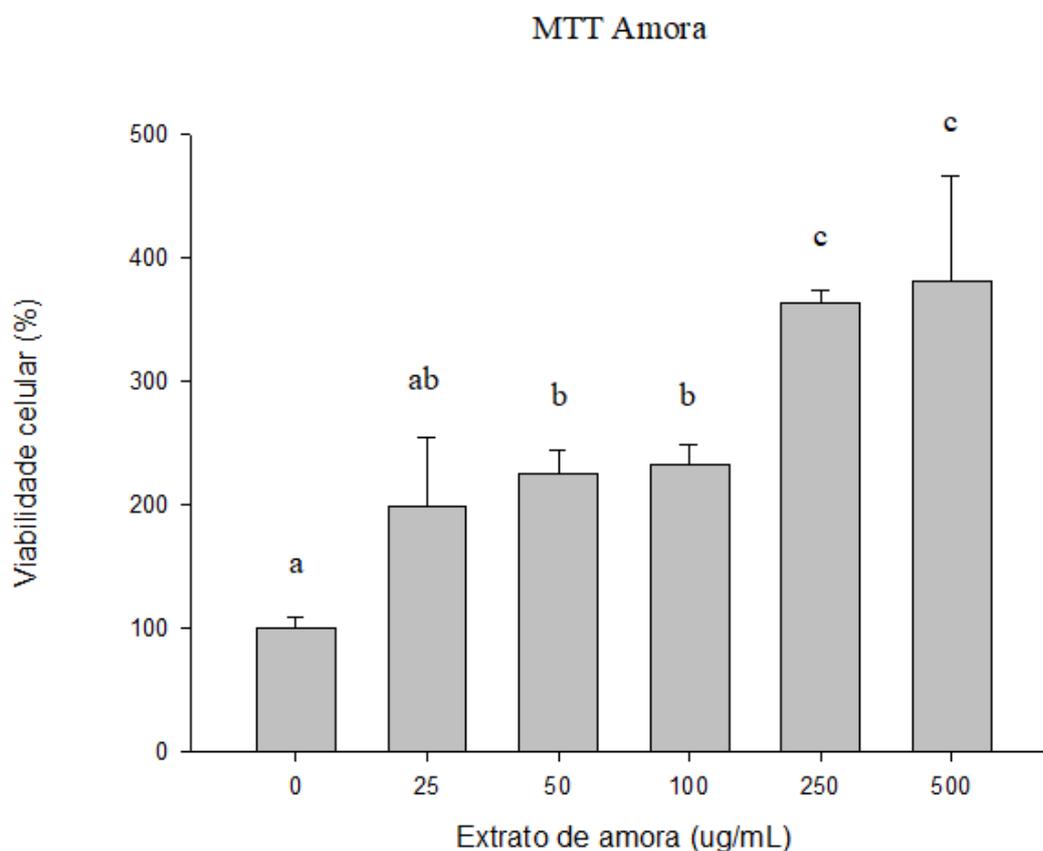


Figura 10. Viabilidade de células expostas por 24h a diferentes concentrações de extrato de amora da cultivar ‘Xavante’ no estágio maduro.

As concentrações de 25, 50 e 100ug/mL de extrato de amora não apresentaram danos oxidativos às células tratadas por 24 horas, como podemos observar na figura 11. Já, as células expostas aos extratos nas concentrações de 250 e 500ug/mL começaram a apresentar alterações, danos oxidativos (figura 11), no entanto continuaram viáveis (figura 10).

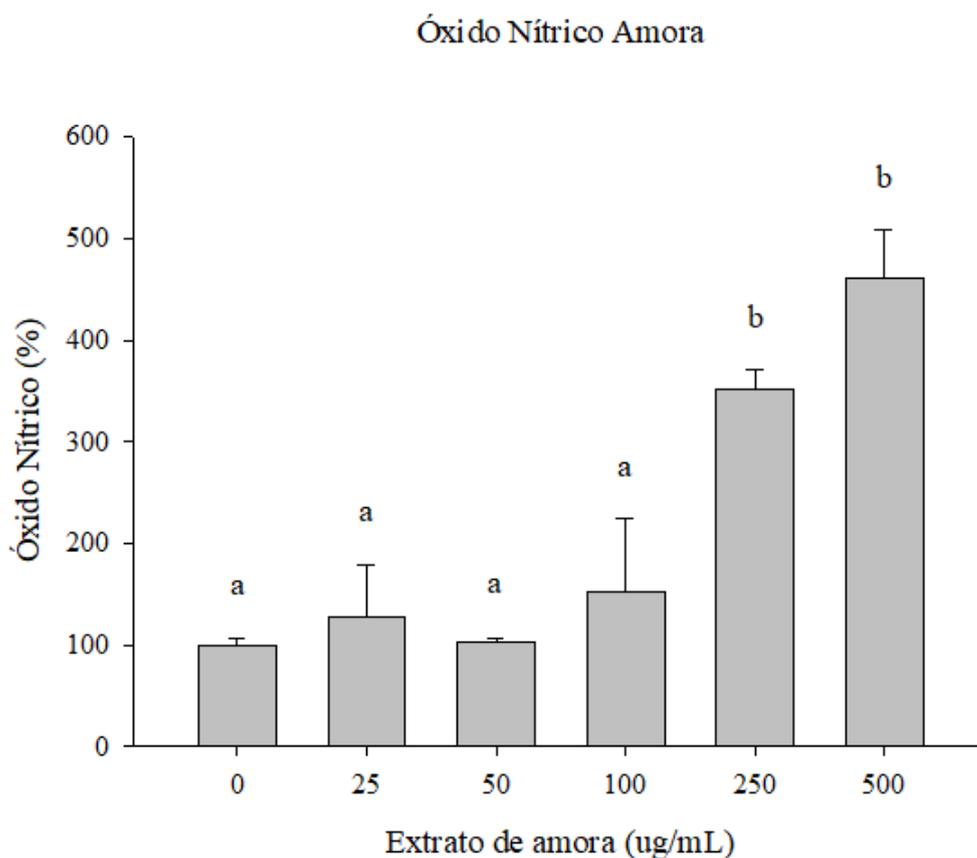


Figura 11. Efeito de diferentes concentrações de extrato de amora, da cultivar ‘Xavante’ no estágio maduro, na produção de óxido nítrico em células tratadas por 24h.

O óxido nítrico é um radical livre diatômico produzido a partir de L-arginina por óxido nítrico indutível e constitutivo (iNOS e cNOS) em numerosas células e tecidos de mamíferos. Acredita-se que algumas doenças inflamatórias crônicas estão associadas com a produção de ON e as antocianinas tem fortes efeitos inibidores na produção deste (KONG et al., 2003). Outros flavonoides também são capazes de diminuir a produção de ON e a expressão da enzima iNOS, dentre os quais podemos citar as flavonas apigenina, luteolina, crisina, o flavonol miricetina e a isoflavona genisteína (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

A MPO é a proteína mais abundante presente em leucócitos polimorfonucleados, ou neutrófilos, que são as primeiras células a serem estimuladas no processo inflamatório (DAVIES, 2011). A MPO é liberada nos fagossomos contendo organismos patogênicos e realiza o *burst* oxidativo produzindo uma grande quantidade de EROs (NUSSBAUM et al., 2013). A MPO catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio a ácido hipocloroso (HOCl), que é um poderoso oxidante com forte ação antimicrobiana. No entanto, a sua produção excessiva pode ocasionar severos danos aos tecidos, pois é extremamente reativa com biomoléculas, contribuindo para o desenvolvimento de doenças como aterosclerose e câncer (KETTLE; WINTERBOURN, 1994).

Na figura 12, podemos observar que o extrato de amora foi capaz de inibir a ação da enzima MPO, sendo nas concentrações 25, 100 e 250ug/mL onde houve uma redução significativa da atividade da MPO em 9,11, 9,79 e 8,44% respectivamente, em relação ao controle. No presente estudo obtivemos bom resultado quanto a inibição da MPO utilizando a cultivar que apresentou o maior teor de CFT. Srivastava et al., (2010) encontraram relação entre a inibição de MPO e teor de CFT. Os pesquisadores testaram, *in vivo*, três cultivares de amora (Navaho, Kiowa e Ouachita) e não encontraram diferença na inibição da MPO entre as cultivares, as atividades anti-inflamatórias das frações da amoreira tiveram correlação com o conteúdo de CFT ( $r = 0,925$ ) e com a atividade antioxidante ( $r = 0,923$ ). Estes resultados sugerem que os efeitos anti-inflamatórios observados a partir de amoras estão diretamente relacionadas ao nível de polifenóis presentes (SRIVASTAVA et al., 2010).

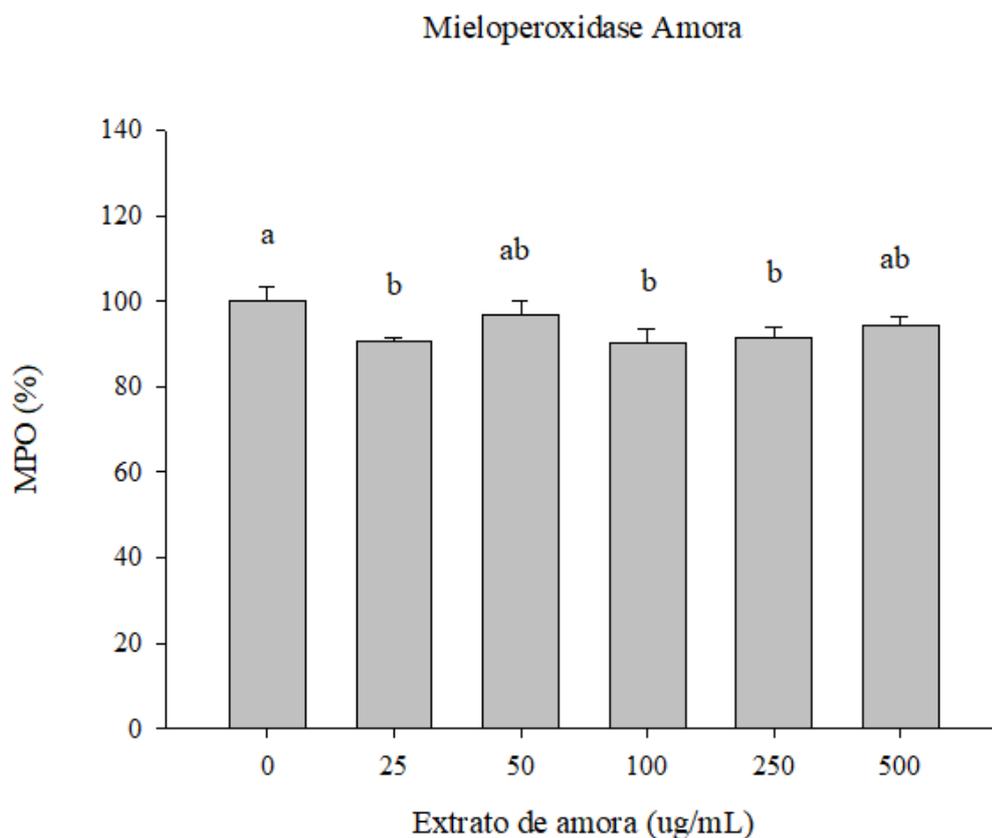


Figura 12. Efeito de diferentes concentrações de extrato de amora, da cultivar ‘Xavante’ no estágio maduro, na produção da enzima MPO em células tratadas por 24h.

### 3.4 CONCLUSÃO

Através deste estudo, foi possível identificar a quercetina como aglicona principal nas amostras de amora-preta avaliadas. Também verificamos que cada cultivar de amora-preta apresenta um comportamento distinto quanto ao teor de CFT entre os estágios de maturação estudados, ou seja, cada cultivar tem um período específico onde o teor destes compostos bioativos está mais potencializado. Todas as cultivares de amora-preta apresentaram maior teor de antocianinas no estágio verde. O teor de flavonoides também foi maior no estágio verde para ‘Cherokee’ e ‘Guarani’. No entanto, ‘Tupy’ e ‘Xavante’ apresentaram os menores teores de flavonoides no estágio verde, sendo indicado os estágios semi-maduro e maduro com o maior percentual de flavonoides para estas duas cultivares. A AAT, pelo método DPPH, apresentou comportamento distinto para cada cultivar entre os estágios de maturação. E considerando apenas a média geral, não houve diferença significativa entre as cultivares quanto AAT pelo método DPPH.

Já, pelo método ABTS, os frutos verdes apresentaram maior atividade antioxidante, exceto para a cultivar ‘Guarani’, e a AAT mostrou correlação positiva com o teor de CFT para os três estágios de maturação. Considerando a média geral, a cultivar ‘Xavante’ apresenta maior teor de CFT entre as cultivares estudadas, e não apresentou diferença significativa entre os estágios de maturação.

O extrato de amora da cultivar ‘Xavante’ no estágio maduro, não apresentou citotoxicidade e aumentou a viabilidade celular a partir da concentração de 50 ug/mL. As concentrações de 25, 50 e 100ug/mL deste extrato não apresentaram danos oxidativos às células tratadas por 24 horas. E as concentrações 25, 100 e 250ug/mL reduziram significativa a atividade da MPO. De acordo com o disposto acima, a amora-preta da cultivar ‘Xavante’ no estágio maduro apresenta potencial para uso terapêutico, sugerindo-se mais estudos *in vivo* relacionados com o estresse oxidativo.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - 001) pela bolsa de estudos recebida durante a realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

ANTUNES, L. E. C. et al. Produção de amoreira-preta no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 100–111, 2014.

AZEVEDO, M. L. De. **Perfil fitoquímico, atividades antioxidante e antimicrobiana de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy em diferentes estádios de maturação cultivada em clima temperado**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Pelotas, 2011.

CANUTO, G. A. B. et al. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196–1205, 2010.

CHEN, W. et al. Blackberry subjected to in vitro gastrointestinal digestion affords protection against Ethyl Carbamate-induced cytotoxicity. **Food Chemistry**, v. 212, p. 620–627, 2016. a.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 48, n. 1, p. 8–19, 2011.

DE LIMA, V. L. A. G. et al. Flavonóides em seleções de acerola (*Malpighia sp L.*). 1-Teor de antocianinas e flavonóis totais. **Ciência Rural**, v. 30, n. 6, p. 1063–1064, 2000.

- DE LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. de A.; LIMA, D. E. da S. Fenólogos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 447–450, 2002.
- DE SOUZA, V. R. et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362–368, 2014. a.
- EMBRAPA. Solos do Estado de Santa Catarina. n. 46, p. 745, 2004.
- FERREIRA, D. S.; ROSSO, V. V. De; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 664–674, 2010.
- FUKUI, M.; YAMABE, N.; ZHU, B. T. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 10, p. 1882–1891, 2010.
- GEORGÉ, S. et al. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **Society**, v. 53, n. 5, p. 1370–1373, 2005.
- GOLDONI, J. **Caracterização físico-química, atividade antimicrobiana de frutos e germinação de Sete Capoteira [Campomanesia guazumifolia (CAMBESS.) O. BERG]**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal Da Fronteira Sul, Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental Erechim, 2017.
- GUEDES, M. N. S. et al. Composição química, compostos bioativos e dissimilaridade genética entre cultivares de amoreira ( *Rubus* spp .) cultivadas no Sul de Minas Gerais. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP**, v. 36, n. 1, p. 206–213, 2014.
- GUEDES, M. N. S. et al. Antioxidant activity and total phenol content of blackberries cultivated in a highland tropical climate. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, n. 1, p. 43, 2017.
- HIRSCH, G. E. **Valor nutricional e capacidade antioxidante de diferentes genótipos de amora-preta ( *Rubus* sp. )**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Santa Maria 2011.
- HUSSAIN, I. et al. Phenology of “Tupy” and “Xavante” blackberries grown in a subtropical area. **Scientia Horticulturae**, v. 201, p. 78–83, 2016.
- ICH. **INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHAMACEUTICALS FOR HUMAN USE: VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY - Q2(R1)**. 2005.
- KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, Christine C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods in Enzymology**, v. 233, n. C, p. 502–512, 1994.
- KONG, J. M. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923–933, 2003.
- LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004.
- LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScienc**, v. 7, n. 1, p. 83–84, 1972.
- LIMA, A. de J. B. et al. Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jaboticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 877–887, 2011.

- MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, p. 33–39, 2008.
- MILIVOJEVIĆ, J. et al. Classification and fingerprinting of different berries based on biochemical profiling and antioxidant capacity. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1285–1294, 2013.
- NOH, H. J. et al. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of *Citrus unshiu* Hyung. **Journal of Ethnopharmacology**, 2015.
- NUSSBAUM, C. et al. Myeloperoxidase: A Leukocyte-Derived Protagonist of Inflammation and Cardiovascular Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 692–713, 2013.
- OLIVEIRA, D. M. et al. Biodegradable coatings on the postharvest of blackberry stored under refrigeration. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 44, n. 2, p. 302–309, 2013.
- PACHECO, S. M. **Frutos da família Myrtaceae: Caracterização físico química e potencial inibitório da atividade das enzimas digestivas**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Pelotas, 2015.
- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. **Comunicado técnico Embrapa**, p. 4, 2007. a.
- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado técnico Embrapa**, p. 4, 2007. b.
- SEGANTINI, D. M. et al. Chemical quality parameters and bioactive compound content of brazilian berries. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 35, n. 3, p. 502–508, 2015.
- SILVA, R. S.; VENDRUSCOLO, J. L.; TORALLES, R. P. Valiação da capacidade antioxidante em frutas produzidas na região Sul do RS. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 17, n. 3–4, p. 392–400, 2011.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI JR, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with phosphomolybdic Phosphotungstic Acid Reagents. **Americal Journal of Enology Viticulture**, v. 16, p. 144, 1965.
- SRIVASTAVA, A. Nita et al. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Polyphenolics from Southeastern U . S . Range Blackberry Cultivars. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 10, p. 6102–6109, 2010.
- SUZUKI, K. et al. Assay Method for Myeloperoxidase in Human Polymorphonuclear Leukocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 132, n. 2, p. 345–352, 1983.
- ZIA-UL-HAQ, M. et al. *Rubus fruticosus* L.: Constituents, biological activities and health related uses. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 10998–11029, 2014.
- ZIELINSK, A. A. F. et al. Blackberry (*Rubus* spp.): influence of ripening and processing on levels of phenolic compounds and antioxidant activity of the ‘Brazos’ and ‘Tupy’ varieties grown in Brazil. **Ciência Rural**, v. 45, n. 4, p. 744–749, 2015.

#### 4. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES CULTIVARES E ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO DE FRAMBOESA

##### RESUMO

As framboesas possuem alto valor nutritivo, são fontes de vitaminas e minerais e podem ser designadas como um alimento funcional, o qual está demonstrado na literatura possuir efeito benéfico, relevante na melhoria do estado de saúde, de bem-estar e na redução do risco de doenças. As propriedades nutracêuticas apresentadas pelos frutos de framboesa estão relacionadas principalmente a atividade antioxidante, devido à presença de alguns compostos como ácidos fenólicos, antocianinas, flavonóis e carotenoides. O objetivo deste estudo foi caracterizar os compostos bioativos e testar a atividade antioxidante *in vitro* em framboesas das cultivares ‘Heritage’ (vermelha) e ‘Fallgoald’ (amarela) em dois estágios de maturação (verde e maduro). Os métodos espectrofotométricos foram utilizados para a caracterização dos compostos, e DPPH e ABTS para Atividade Antioxidante Total (AAT), bem como testes de viabilidade celular (MTT) e de citotoxicidade (óxido nítrico e mieloperoxidase (MPO)). A cultivar ‘Heritage’ demonstrou melhores teores de compostos bioativos comparados a ‘Fallgoald’. Os frutos de framboesa no estágio maduro são indicados quando os compostos de interesse forem flavonoides e antocianinas e no estágio verde quando os compostos de interesse forem fenólicos totais (CFT) para esta cultivar. A AAT não diferiu entre as cultivares, apenas entre os estágios de maturação pelo método ABTS, onde o estágio verde apresentou melhor AAT que o estágio maduro. No estágio de maturação verde, a AAT teve correlação com o teor de CFT. O extrato de framboesa da cultivar ‘Heritage’ no estágio comercial, aumentou a viabilidade celular e as concentrações de 25, 50, 100, e 250ug/mL não apresentaram danos oxidativos às células tratadas por 24 horas. As concentrações 50 e 100ug/mL foram capazes de reduzir significativamente a enzima MPO. Assim, framboesas vermelhas se destacaram quanto ao teor de compostos bioativos em relação as framboesas amarelas e os frutos verdes apresentaram melhor atividade antioxidante, pelo método ABTS, em relação aos frutos maduros.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Berry*. Framboesa. Compostos Bioativos. Nutracêutica.

## ABSTRACT

Raspberries have high nutritional value, are sources of vitamins and minerals and can be designated as a functional food, which has been shown in the literature to have a beneficial and relevant effect on improving health status, well being and reducing the risk of diseases. The nutraceutical properties presented by raspberry fruits are mainly related to antioxidant activity, due to the presence of some compounds such as phenolic acids, anthocyanins, flavonols and carotenoids. The objective of this study was to characterize the bioactive compounds and to test the antioxidant activity in raspberries of the cultivars 'Heritage' (red) and 'Fallgoald' (yellow) in two stages of maturation (unripe and ripe). Spectrophotometric methods were used to characterize the compounds and the DPPH and ABTS methods for Total Antioxidant Activity (AAT), as well as cell viability (MTT) and cytotoxicity tests (nitric oxide and myeloperoxidase (MPO)). The cultivar 'Heritage' showed better bioactive compounds contents compared to 'Fallgoald'. Ripe raspberry fruits are indicated when the compounds of interest are flavonoids and anthocyanins and unripe raspberry fruits when the compound of interest is CFT for this cultivar. The AAT did not differ among cultivars, only between maturation stages by the ABTS method, where the unripe fruits presented better AAT than ripe fruits. At the unripe stage, the AAT correlated with the CFT content. Raspberry extract from 'Heritage' cultivar at the ripe stage increased cell viability and concentrations of 25, 50, 100, and 250 ug / mL did not present oxidative damage to treated cells for 24 hours. Concentrations of 50 and 100ug / mL were able to significantly reduce the MPO enzyme. Thus, red raspberries stood out as to the content of bioactive compounds compared to yellow raspberries and the unripe fruits presented better antioxidant activity, by the ABTS method, in relation to the ripe fruits.

**KEYWORDS:** Berry. Raspberry. Bioactive compounds. Food analysis.

## 4.1 INTRODUÇÃO

As framboesas possuem alto valor nutritivo, são fontes de vitaminas e minerais, além de atraírem o consumidor tanto pelo aspecto visual como gustativo, constituindo excelente alimento refrescante. Pode ser designada alimento funcional, o qual está demonstrado possuir efeito benéfico, relevante na melhoria do estado de saúde, de bem-estar e na redução do risco de doenças (ANVISA, 1999; SOUSA, 2007b).

Estudos realizados com diferentes cultivares de framboesa têm demonstrado o potencial de seus compostos bioativos na carcinogênese e na imunoterapia de diversos cânceres (KNOBLOCH et al., 2015; MACE et al., 2014; SHI et al., 2016; WARNER et al., 2014), seu potencial como anti-inflamatório (BIBI et al., 2018; SHIN et al., 2014), potencial neuroprotetor (GARCIA et al., 2017; IM et al., 2013) na prevenção e tratamento do Alzheimer (ZHOU et al., 2017) e no controle de diversas doenças crônicas não transmissíveis (Noratto; Chew; Atienza, 2017; Xiao et al., 2017; Jeong et al., 2016). As propriedades nutracêuticas apresentadas pelos frutos de framboesa estão relacionadas principalmente a atividade antioxidante, devido à presença de alguns compostos como ácidos fenólicos, antocianinas, flavonóis e carotenóides (CHEN et al., 2013; DE SOUZA et al., 2014b; FU et al., 2015; MAKSIMOVIC et al., 2013).

Atualmente um dos grandes desafios da pesquisa é a substituição de compostos antioxidantes sintéticos por substâncias provenientes de produtos vegetais. A ênfase na busca por produtos que atendam essa demanda tem aumentado substancialmente, sendo necessários estudos que identifiquem quais as possíveis fontes desses compostos na natureza e elucidem os processos relacionados com a sua produção nas plantas (CROGE, 2015).

Diferenças quanto à composição de compostos bioativos e atividade antioxidante de framboesa são encontrados devido ao solo, o clima, práticas agrícolas, qualidade da água de irrigação, cultivar, estágio de maturação, colheita, tamanho do fruto e condições de armazenamento do fruto (FU et al., 2015; PLESSI; BERTELLI; ALBASINI, 2007; ZHAO et al., 2007).

Algumas mudanças nas framboesas durante a sua maturação são visíveis, tais como a cor, devido ao desenvolvimento de metabólitos secundários, e o aroma, devido à produção de compostos voláteis (PLESSI; BERTELLI; ALBASINI, 2007). Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar os compostos bioativos e testar a atividade antioxidante *in vitro* em framboesas das cultivares ‘Heritage’ (vermelha) e ‘Fallgoald’ (amarela) em dois estágios de maturação (verde e maduro).

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

As framboesas foram adquiridas do pomar de fruticultura da Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Chapecó, que está situado a uma latitude de 27°07'11"S, longitude de 52°42'30"O e a uma altitude de 605 metros em relação ao nível médio dos mares. O clima do local, segundo a classificação de Köppen, é de categoria C, subtipo Cfa (Clima Subtropical úmido), com inverno frio e úmido e verão moderado e seco. O solo é denominado Latossolo Vermelho Distroférrico (EMBRAPA, 2004).

Na colheita das frutas foi adotado um plano de amostragem sistemático por cultivar e estágio de maturação, sempre no período da manhã, onde estas foram higienizadas (lavadas, cloradas por pelo menos 15 minutos e enxaguadas), acondicionadas em sacos plásticos e congeladas a -80°C até o momento das análises. As unidades experimentais por cultivar e estágio de maturação foram compostas por 150g de frutas cada, ou seja, em torno de 500g de frutas colhidas por cultivar e estágio de maturação. As análises de caracterização dos compostos e da atividade antioxidante foram realizadas em triplicata.

Duas cultivares de framboesa (*'Heritage'* e *'Fallgold'*) foram colhidas, com dois estágios de maturação (figura 13).

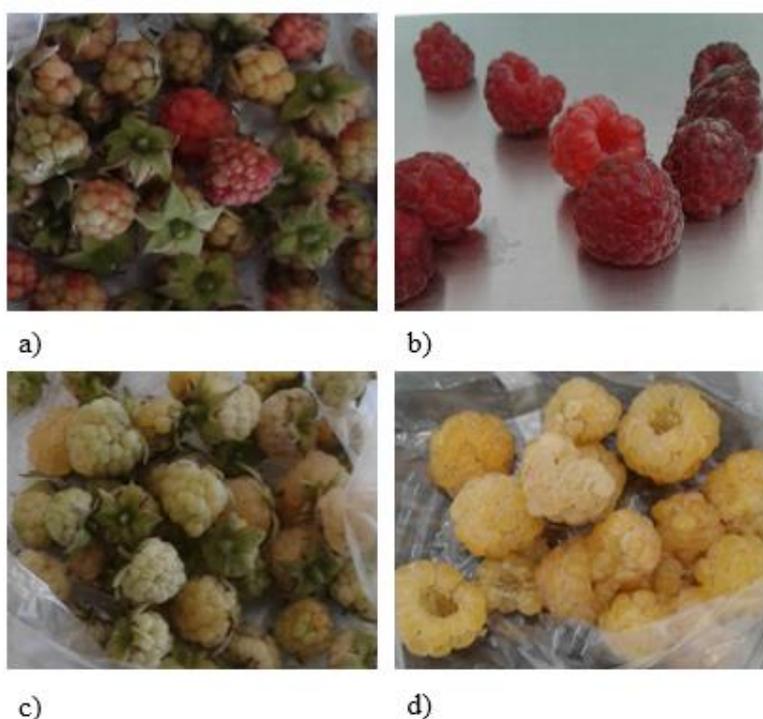


Figura 13. Estágios de maturação de framboesa: a) *'Heritage'* бага verde b) *'Heritage'* бага madura c) *'Fallgoald'* бага verde d) *'Fallgoald'* бага madura.

#### 4.2.1 EXTRAÇÃO

A metodologia de extração dos compostos bioativos de framboesa foi segundo Maksimovic et al. (2013), com pequenas modificações. Cinco gramas de fruta foram homogeneizados com 20mL de solução extratora composta por metanol/H<sub>2</sub>O/HCl (70:30:5 proporção por volume) durante um minuto. Em seguida, o homogeneizado foi filtrado em papel filtro e armazenado a -80°C até o momento das análises. O extrato foi utilizado para as análises de Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante.

#### 4.2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

A quantificação dos CFT ocorreu pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton; Rossi JR. (1965) e modificado por Georgé et al. (2005). Onde, 0,5mL do extrato com 2,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu foram deixados em repouso por cinco minutos a temperatura ambiente e adicionados 2,0mL de carbonato de sódio 4% e incubados a temperatura ambiente, no escuro, por duas horas. Então realizada a leitura em espectrofotômetro em  $\lambda=760\text{nm}$ . Utilizou-se ácido gálico (AG) como um padrão para a curva de calibração, a qual foi construída nas concentrações de 2,5; 5; 10; 25; 50; 75; 100 e 120ppm de AG. Os resultados foram expressos em miligramas de EAG (EAG = equivalente de ácido gálico) por grama de amostra (mg EAG/g).

#### 4.2.3 ANTOCIANINAS E FLAVONÓIDES TOTAIS

A extração e quantificação de antocianinas e flavonoides totais foi conforme metodologia de Lees; Francis (1972), com algumas modificações. Onde, 5g de fruta foram triturados com 100mL de solução extratora composta por metanol/HCl (85:15 proporção por volume) e armazenado em temperatura ambiente ao abrigo de luz por 20h. Após as 20h, o extrato foi filtrado e lavado com 25mL da solução extratora e deixado em repouso ao abrigo de luz por 2h. Então, retirou-se 1mL da amostra e adicionou-se mais 10mL da solução extratora e agitou-se em vortex antes da leitura. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro em  $\lambda=374\text{nm}$  para flavonóides e em  $\lambda=535\text{nm}$  para antocianinas.

Para os cálculos foram utilizadas as seguintes equações:

- Flavonoides:  $(\text{Valor da absorbância} \times \text{Fator de diluição}) / 76,6$
- Antocianinas:  $(\text{Valor da absorbância} \times \text{Fator de diluição}) / 98,2$

Onde: Fator de diluição =  $\xi$  (quantidade de solução extratora utilizada na maceração e na filtração / quantidade de extrato vegetal utilizado pra compor a amostra) x quantidade de solução extratora adicionada a amostra final utilizada. Os resultados foram expressos em miligramas por grama de amostra (mg/g).

#### 4.2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL ABTS

A atividade antioxidante total foi avaliada através da capacidade antioxidante de equivalentes de trolox (TEAC), método que mede a capacidade da amostra em extinguir o radical livre ABTS<sup>+</sup> em ambientes lipofílicos e hidrofílicos segundo Rufino et al. (2007). Homogeneizou-se 5g de fruta com 40 mL de metanol 50% e deixou-se em repouso por 1h em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 4500 rpm por 15 minutos e separou-se o sobrenadante. Então, foi adicionado 40 mL de acetona 70% a amostra residual do tubo de centrifugação que também foi homogeneizada e deixada em repouso por 1h à temperatura ambiente, centrifugada novamente a 15000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi adicionado ao sobrenadante da primeira centrifugação e completado volume até 100 mL com água destilada em um balão volumétrico, e assim obtido o extrato.

A partir do extrato foi preparado três diluições (25, 50 e 100%). Uma alíquota de 30  $\mu$ L de cada diluição do extrato foi adicionada a 3,0 mL do radical ABTS<sup>+</sup> e a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a  $\lambda=734\text{nm}$  após 6 minutos da mistura. O metanol foi utilizado como branco para calibrar o equipamento. Para o cálculo da AAT foi substituído na equação da reta, gerada a partir das diferentes concentrações do extrato, a absorbância correspondente a 1000  $\mu\text{M}$  de trolox. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  trolox / g de amostra.

#### 4.2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DPPH

A atividade antioxidante total também foi avaliada através do princípio da captura do radical livre DPPH por antioxidantes, com base na metodologia proposta por Rufino et al. (2007b). O extrato foi realizado da mesma maneira descrita anteriormente para o ensaio ABTS.

A partir do extrato foram realizadas três diluições (25, 50 e 100%) para o cálculo da concentração do composto e determinação do efeito em 50% - EC<sub>50</sub>. Uma alíquota de 0,1 mL de cada amostra foi adicionada em 3,9 mL de solução 0,06 mM do radical DPPH e a sua absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a  $\lambda=515\text{nm}$  até estabilização ( $\pm 11$  minutos).

Para calibrar o equipamento foi utilizado como branco o metanol e como controle uma solução de metanol, acetona e água. Os dados obtidos foram confrontados com a curva padrão do DPPH, elaborada através da leitura de diferentes diluições do radical. Os resultados foram expressos em gramas de fruto/gramas de DPPH.

#### 4.2.6 CULTIVO CELULAR

No cultivo celular foram utilizadas as células polimorfonucleares do sangue. Sangue humano foi coletado e as células extraídas e mantidas em cultivo. As células foram contadas em microscópio óptico e a concentração de  $1 \times 10^8$  cultivada em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e antifúngico, e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C.

O extrato de amora descrito no item 3.2.1 foi rotaevaporado, liofilizado e posteriormente diluído em água. Após 24 horas de adaptação na placa de cultivo, as células foram tratadas com diferentes concentrações (0, 25, 50, 100, 250 e 500ug/mL) deste extrato. As células ficaram expostas ao extrato de amora por 24 horas e então foram realizadas as análises de viabilidade celular, produção de óxido nítrico e mieloperoxidase.

#### 4.2.7 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT 3-(4, 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, segundo Fukui; Yamabe; Zhu (2010). As células foram cultivadas em placas de 96 poços e coradas com 10μL do reagente de MTT e 90μL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) durante 1 h a 37°C. Então, centrifugou-se por 10 minutos a 2000rpm, retitou-se e descartou-se 70μL do sobrenadante e adicionou-se 70μL de dimetilsulfóxido (DMSO), e a absorbância foi medida a  $\lambda = 560$  nm. Os resultados foram expressos em percentual, comparando-se a percentagem da absorbância com a percentagem do controle negativo.

$$\text{Absorbância \%} = (\text{Absorbância} \times 100) / \text{média do controle negativo}$$

#### 4.2.8 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (ON)

Níveis de óxido nítrico foram estimados medindo a concentração de nitritos ( $\text{NO}_2$ ), o produto final estável do metabolismo de óxido nítrico, em meios de cultura com o reagente de Griess. Foi colocado 100 $\mu\text{l}$  do sobrenadante em uma placa e adicionar 100 $\mu\text{l}$  do reagente de Griess, incubado por 10min em temperatura ambiente e realiza a leitura em  $\lambda= 540\text{nm}$  (NOH et al., 2015). Os resultados foram expressos em percentual, comparando-se a percentagem da absorbância com a percentagem do controle negativo.

$$\text{Absorbância \%} = (\text{Absorbância} \times 100) / \text{média do controle negativo}$$

#### 4.2.9 MIELOPEROXIDASE (MPO)

Os níveis de MPO foram avaliados segundo Suzuki et al. (1983). Em uma placa foi pipetado 12 $\mu\text{l}$  de sobrenadante e adicionado 148 $\mu\text{l}$  de aminoantipirina 25mM, mais 170  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,7mM e incubado 30 min a 37°C. Na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente oxidante, a MPO catalisa o acoplamento oxidativo de fenol e aminoantipirina originando um produto colorido, a quinoneimina, com uma absorbância máxima de  $\lambda= 500\text{nm}$ . Assim, a leitura foi realizada em  $\lambda= 492\text{nm}$ . Os resultados foram expressos em percentual, comparando-se a percentagem da absorbância com a percentagem do controle negativo.

$$\text{Absorbância \%} = (\text{Absorbância} \times 100) / \text{média do controle negativo}$$

#### 4.2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro Wilk. A análise de variância (ANOVA) utilizada para avaliar a influência das diferentes cultivares e dos estágios de maturação no teor de compostos bioativos e na atividade antioxidante das frutas. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O programa utilizado foi Sisvar 5.6. Também foi realizada a correlação entre o teor dos diferentes compostos analisado com a AAT, o teste utilizado foi Spearman`s Rho e o programa JMP 5.1.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cultivar ‘Heritage’(vermelha) demonstrou melhores teores de antocianinas, flavonoides (tabela 7) e CFT (tabela 8) em relação a ‘Fallgoald’ (amarela). Quanto a diferença entre os estágios de maturação, para a ‘Fallgoald’, o teor de antocianinas e de flavonoides não diferiram entre os

estágios verde e maduro (tabela 7). A ‘Heritage’ apresentou teor de flavonoides maior no estágio maduro em relação ao verde, o mesmo aconteceu para o teor de antocianinas, que chegou a ser mais de 10 vezes maior no estágio maduro em relação ao estágio verde para esta cultivar (tabela 7). Para ambas as cultivares, ‘Heritage’ e ‘Fallgold’, o fruto verde apresentou maiores teores de CFT (tabela 9).

Tabela 7- Conteúdo de Antocianinas, Flavonoides de framboesas de diferentes cultivares e estágios de maturação.

Cultivar	Verde	Maduro	Média geral
Fallgold	0,30 ± 0,19aA	0,34 ± 0,19aA	0,32 ± 0,17a
Heritage	1,85 ± 0,06bA	19,28 ± 1,08bB	10,56 ± 9,58b
Média geral	1,07 ± 0,86A	9,81 ± 10,40B	
Flavonoides (mg.100g <sup>-1</sup> MF)			
Fallgold	4,41 ± 0,16aA	5,93 ± 2,12aA	5,17 ± 1,58a
Heritage	12,81 ± 0,24bA	18,93 ± 1,14bB	15,87 ± 3,43b
Média geral	8,61 ± 4,61A	12,43 ± 7,28B	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Carvalho et al. (2013) promoveram estudos para compreender as diferenças na biossíntese de flavonóides em framboesas vermelhas e amarelas. Entre as diferenças encontradas, além da falta de antocianinas, as variedades amarelas aparentemente não possuem procianidina B1 (epicatequina-(4b / 8) - dímero de catequina), que estava presente em todas as variedades vermelhas investigadas.

No estudo realizado por Kula et al. (2016) onde foi realizada uma comparação quantitativa e qualitativa dos perfis de antocianina e ellagitaninos nos frutos de várias cultivares de framboesa vermelha (*R. idaeus*) e framboesa preta (*R. occidentalis*) cultivados na Polônia, a cultivar ‘Heritage’ apresentou níveis significativamente maiores de antocianinas, juntamente com a ‘Polka’ e ‘Polesie’. Segantini et al. (2015) também encontraram conteúdo de fenólicos totais e de antocianinas totais maiores para a cultivar ‘Heritage’ (3,58 GAE kg<sup>-1</sup>fw e 0,53 CGE kg<sup>-1</sup>fw respectivamente) do que para ‘Fallgold’ (2,03 GAE kg<sup>-1</sup>fw e 0,04 CGE kg<sup>-1</sup>fw respectivamente). ‘Fallgold’ (polpa amarela) apresentou a menor capacidade antioxidante, com 14,13 mol eq. trolox kg<sup>-1</sup>fw, e o baixo teor de antocianinas poderia estar relacionado com a sua baixa capacidade antioxidante (SEGANTINI et al., 2015).

Segundo Souza et al., (2014) que seguem a classificação de Hassimoto et al. (2005), as framboesas vermelhas juntamente com as amoras são boas fontes de antioxidantes enquanto que outras pequenas frutas como morango, cereja e mirtilo possuem atividade antioxidante

intermediária. No presente estudo, a AAT pelo método ABTS e DPPH não diferiu entre as cultivares de framboesas amarela e vermelha (tabela 8), no entanto, o estágio de maturação verde, pelo método ABTS, demonstrou maior atividade antioxidante que no estágio maduro (tabela 9).

Tabela 8- Conteúdo de Compostos fenólicos Totais e Atividade antioxidante total de diferentes cultivares de framboesa.

<i>Cultivar</i>	<i>CFT</i> (mg EAG/g)	<i>AAT - ABTS</i> ( $\mu\text{M trolox g}^{-1}$ amostra)	<i>AAT - DPPH</i> ( $\text{EC}_{50}$ g de fruta $\text{g}^{-1}$ DPPH)
<i>Fallgoald</i>	1,11 $\pm$ 0,20a	12410,03 $\pm$ 2003,31a	21,79 $\pm$ 3,52a
<i>Heritage</i>	1,30 $\pm$ 0,15b	14316,58 $\pm$ 1727,28a	24,78 $\pm$ 1,73a

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 9- Conteúdo Compostos fenólicos Totais e Atividade antioxidante total de diferentes estágios de maturação de framboesa.

<i>Estágio de maturação</i>	<i>CFT</i> (mg EAG/g)	<i>AAT - ABTS</i> ( $\mu\text{M trolox g}^{-1}$ amostra)	<i>AAT - DPPH</i> ( $\text{EC}_{50}$ g de fruta $\text{g}^{-1}$ DPPH)
<i>Verde</i>	1,36 $\pm$ 0,08b	14599,36 $\pm$ 2011,83b	22,00 $\pm$ 3,23a
<i>Maduro</i>	1,05 $\pm$ 0,15a	12127,26 $\pm$ 1211,40a	24,57 $\pm$ 2,52a

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No estágio de maturação verde, a AAT teve correlação com o teor de CFT, DPPH ( $r = -0,8286$ ) e ABTS ( $r = 0,8286$ ). Salientamos que a correlação foi positiva entre o teor de CFT e AAT para ambos os métodos, pois no teste DPPH quanto menor o valor de  $\text{EC}_{50}$ , maior a atividade antioxidante do composto analisado. A relação entre AAT e o teor de CFT vem sendo encontrada em diversos estudos, tanto em estudos com diversos berries (CHEN et al., 2013), quanto com framboesas (FU et al., 2015; MAKSIMOVIC et al., 2013).

As análises de viabilidade celular (figura 14), óxido nítrico (figura 15) e mieloperoxidase (figura 16) foram realizadas apenas com a cultivar ‘Heritage’, por ter os melhores resultados quanto ao teor de CFT, no entanto, o estágio de maturação utilizado foi o maduro, por ser o estágio de maturação comercial.

As diferentes concentrações de extrato de framboesa aumentaram a viabilidade celular, ou seja, não apresentaram citotoxicidade para as células tratadas por 24 horas (figura 14). Chen et al. (2016b) investigaram o efeito protetor de extrato de framboesa e extrato de framboesa que passou por uma digestão gastrointestinal simulada *in vitro* contra dano oxidativo induzido por acrilamida

(AA) em células Caco-2. A viabilidade celular foi significativamente reduzida para 61,6% na presença de 2,5mM AA em comparação com o grupo controle. O extrato de framboesa aumentou a viabilidade celular em 11,2% e o extrato digerido aumentou em 29,6% em relação ao grupo tratado com AA. Em outro estudo, Chen et al. (2016c) estudaram o efeito protetor da framboesa submetido a digestão gastrointestinal simulada *in vitro* no estresse oxidativo induzido por Ethyl carbamate (EC) em células Caco-2. A viabilidade celular do pré-tratamento com extrato digerido foi aumentada em 23% em comparação com a do grupo EC. O pré-tratamento com extrato bruto aumentou 5,87%, o que indicou que o extrato digerido pode efetivamente melhorar a citotoxicidade induzida pela EC.

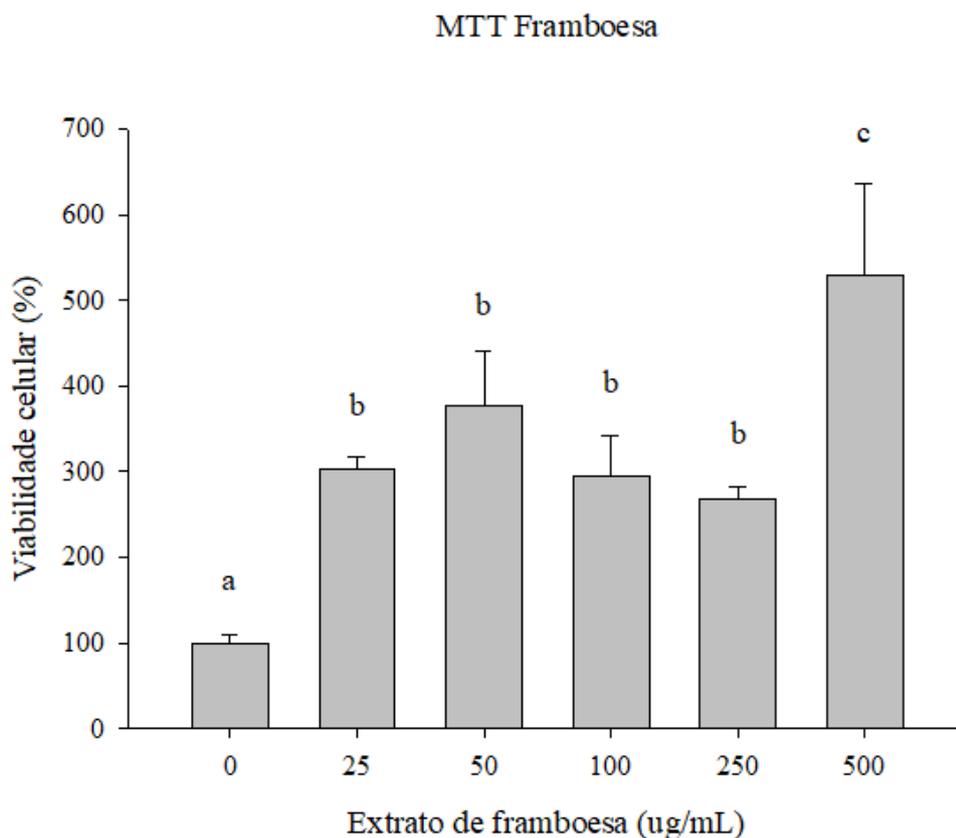


Figura 14. Viabilidade de células expostas por 24h a diferentes concentrações de extrato de framboesa da cultivar ‘Heritage’ no estágio maduro.

Im et al. (2013) testaram o efeito protetor de duas frações, antocianinas e não antocianinas, de extrato de framboesa em células neuronais de PC-12. A fração de antocianina, em concentrações de 1, 10 e 100 Ig/ml, aumentou significativamente a viabilidade de células PC-12 expostas a 50 mL

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma dependente da dose. Um efeito semelhante também foi observado com todo o extrato, enquanto a fração não antocianina diminuiu significativamente a viabilidade celular a 100 Ig/ml. Embora a viabilidade aumentada de células PC-12 neuronais possa, em parte, ser explicada pelo efeito antioxidante das antocianinas, foi levantada a possibilidade de certos compostos nas frações não antocianinas apresentarem efeitos tóxicos para as células *in vitro* em altas concentrações (IM et al., 2013).

Zhou et al. (2017) investigaram os constituintes químicos da framboesa vermelha com potenciais para o tratamento da doença de Alzheimer. Os resultados obtidos mostraram que 200 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderia reduzir a viabilidade celular para 53,5% em comparação com o grupo controle. Os compostos 2a (7R,8R-4,7,9,9-tetrahydroxy-3-methoxy-8-O-4-neolignan), 2b (7S,8S-4,7,9,9-tetrahydroxy-3-methoxy-8-O-4-neolignan) e 3a (8R-4,7,9,9-tetrahidroxi-3,3-dimetoxi-8-O-4-neolignano) apresentaram efeitos neuroprotetivos estatisticamente significativos a uma concentração de 100 µM (as viabilidades celulares foram 70,8%, 80,6% e 69,1%, respectivamente), em comparação com o grupo modelo.

As concentrações de extrato de framboesa testadas não foram capazes de inibir a produção de óxido nítrico, no entanto as concentrações de 25, 50, 100, e 250ug/mL não apresentaram danos oxidativos às células tratadas por 24 horas (figura 15). No estudo de Garcia et al. (2017) a fração digerida de framboesa foi capaz de inibir a produção de óxido nítrico, entre outros fatores, o que resultou na inibição da ativação pró-inflamatória microglial por lipopolissacarídeos. Salientando assim, o potencial anti-inflamatório dos polifenóis de framboesa vermelha (*Rubus idaeus*) como abordagem preventiva para a neuroinflamação (GARCIA et al., 2017). No carcinoma de células escamosas esofágicas induzidas por carcinogênio em ratos, framboesas pretas liofilizadas foram capazes de suprimir a expressão e a atividade de óxido nítrico indutível (iNOS) (SHI et al., 2016).

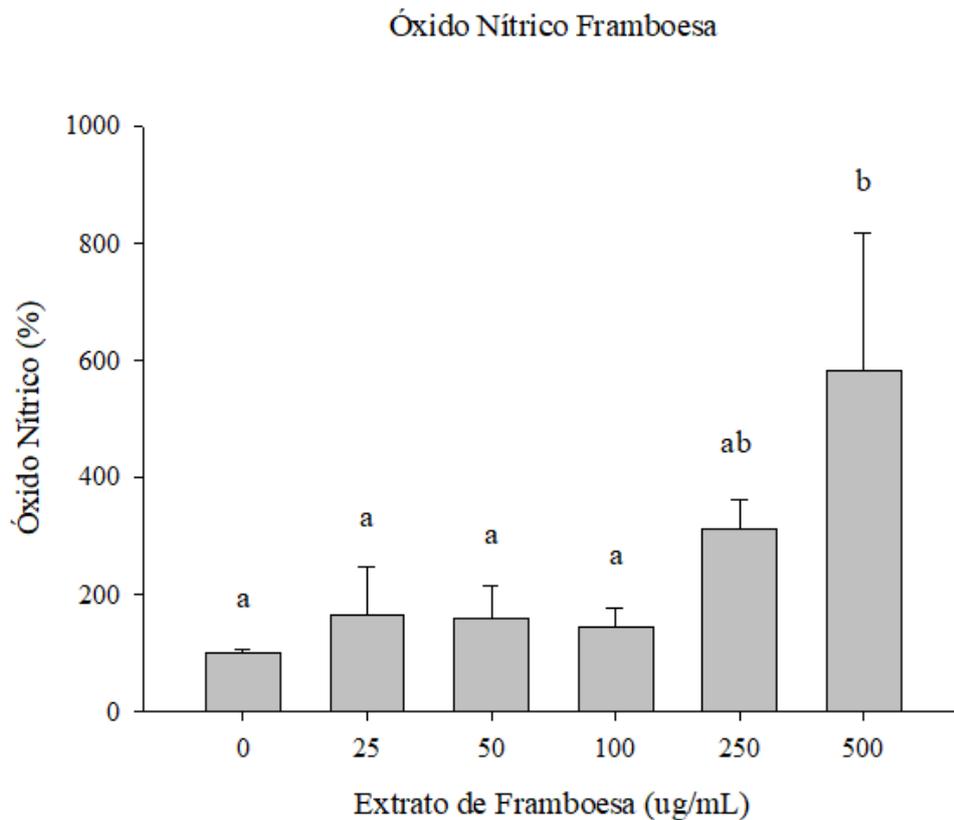


Figura 15. Efeito de diferentes concentrações de extrato de framboesa, da cultivar ‘Heritage’ no estágio maduro, na produção de óxido nítrico em células tratadas por 24h.

Quanto a enzima MPO, podemos observar na figura 16 que as diferentes concentrações do extrato de framboesa foram capazes de inibir a ação da enzima, sendo que a redução foi significativa para as concentrações 50 e 100ug/mL, onde a redução foi de 9,11 e 8,77% respectivamente, em relação ao controle. A presença de compostos fenólicos como os flavonóis (quercetina e miricetina) podem ser os compostos responsáveis pela modulação negativa da ação da enzima MPO, sendo que a presença do grupo catecol nestas substâncias mostrou-se importante para a inibição enzimática (DOS SANTOS, 2010).

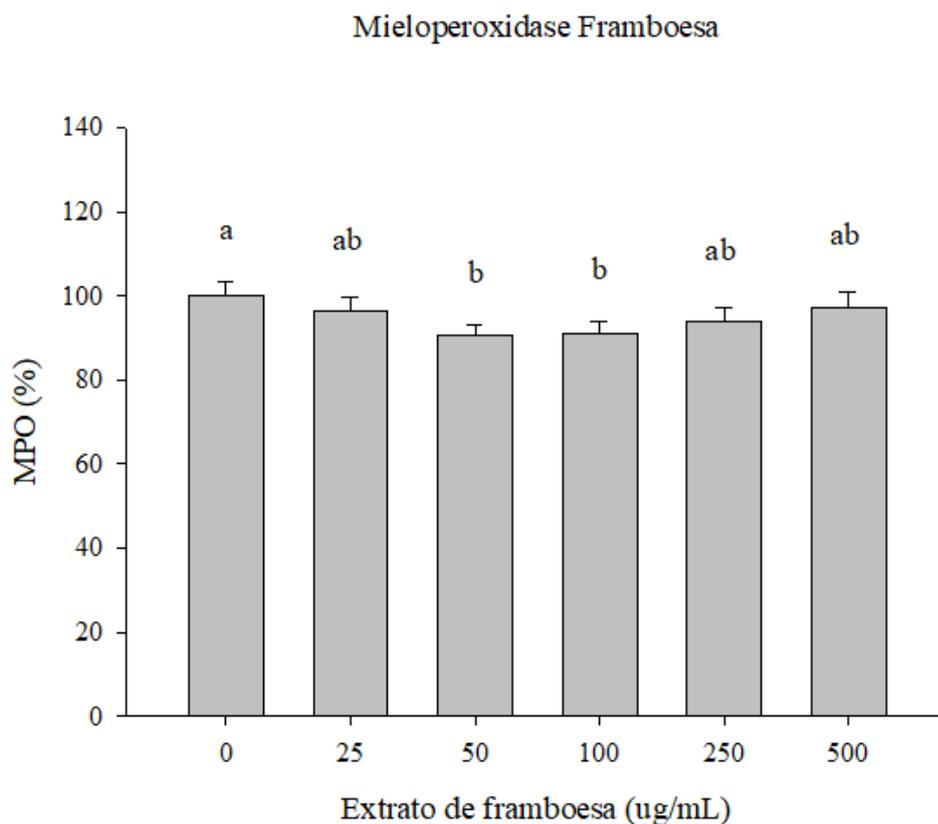


Figura 16. Efeito de diferentes concentrações de extrato de framboesa, da cultivar ‘Heritage’ no estágio maduro, na produção da enzima MPO em células tratadas por 24h.

#### 4.4 CONCLUSÃO

A cultivar ‘Heritage’ demonstrou melhores teores de compostos bioativos comparados a ‘Fallgoald’. Os frutos de framboesa no estágio maduro são indicados quando os compostos de interesse forem flavonoides e antocianinas e no estágio verde quando o composto de interesse for CFT para esta cultivar.

A AAT não diferiu entre as cultivares, apenas entre os estágios de maturação pelo método ABTS, onde o estágio verde apresentou melhor AAT que o estágio maduro. No estágio de maturação verde, a AAT apresentou correlação com o teor de CFT.

O extrato de framboesa da cultivar ‘Heritage no estágio comercial, ou seja, maduro, aumentou a viabilidade celular. As concentrações de 25, 50, 100, e 250ug/mL não apresentaram danos oxidativos às células tratadas por 24 horas, e as concentrações 50 e 100ug/mL do extrato de framboesa foram capazes de reduzir significativamente a atividade da enzima MPO.

Assim, as framboesas vermelhas se destacaram quanto ao teor de compostos bioativos em relação as framboesas amarelas. E os frutos verdes apresentaram melhor atividade antioxidante em relação aos frutos maduros, pelo método ABTS.

#### AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - 001) pela bolsa de estudos recebida durante a realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Portaria n° 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos.** 1999.
- BIBI, S. et al. Dietary red raspberries attenuate dextran sulfate sodium-induced acute colitis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 51, p. 40–46, 2018.
- CARVALHO, E. et al. A targeted metabolomics approach to understand differences in flavonoid biosynthesis in red and yellow raspberries. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 79–86, 2013.
- CHEN, L. et al. Phytochemical properties and antioxidant capacities of various colored berries. **J Sci Food Agric**, v. 94, p. 180–188, 2013.
- CHEN, W. et al. Blackberry subjected to in vitro gastrointestinal digestion affords protection against Ethyl Carbamate-induced cytotoxicity. **Food Chemistry**, v. 212, p. 620–627, 2016. a.
- CHEN, W. et al. Protective effect of wild raspberry ( *Rubus hirsutus* Thunb . ) extract against acrylamide-induced oxidative damage is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 196, p. 943–952, 2016. b.
- DE SOUZA, V. R. et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362–368, 2014.
- DOS SANTOS, E. de O. L. **Mecanismo de ação de flavonoides no metabolismo oxidativo e na fagocitose de neutrófilos humanos desencadeados por receptores Fc gama e CR.** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêutica, Ribeirão Preto, 2010.
- EMBRAPA. Solos do Estado de Santa Catarina. n. 46, p. 745, 2004.
- FU, Y. et al. LWT - Food Science and Technology Chemical composition and antioxidant activity of Chinese wild raspberry ( *Rubus hirsutus* Thunb.). **Food Science and Technology**, v. 60, p. 1262–1268, 2015.
- FUKUI, M.; YAMABE, N.; ZHU, B. T. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 10, p. 1882–1891, 2010.
- GARCIA, G. et al. Bioaccessible ( poly ) phenol metabolites from raspberry protect neural cells from oxidative stress and attenuate microglia activation. **Food Chemistry**, v. 215, p. 274–283, 2017.
- GEORGÉ, S. et al. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **Society**, v. 53, n. 5, p. 1370–1373, 2005.
- HASSIMOTTO, N. M. A. et al. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 702–708, 2008.
- IM, S. et al. Anthocyanins in the ripe fruits of *Rubus coreanus* Miquel and their protective effect on neuronal PC-12 cells. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 604–610, 2013.
- JEONG, M. D. H. S. Effects of *Rubus occidentalis* extract on blood pressure in patients with

prehypertension: Randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Nutrition*, v. 32, p. 461-467, 2016.

KNOBLOCH, T. J. et al. Suppression of proinflammatory and prosurvival biomarkers in oral cancer patients consuming a black raspberry phytochemical-rich troche. ***Cancer Prevention Research***, v. 9, n. 2, p. 159–171, 2015.

KULA, M. et al. Phenolic composition of fruits from different cultivars of red and black raspberries grown in Poland. ***Journal of Food Composition and Analysis***, v. 52, p. 74–82, 2016.

LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. ***HortScienc***, v. 7, n. 1, p. 83–84, 1972.

MACE, T. A. et al. Bioactive compounds or metabolites from black raspberries modulate T lymphocyte proliferation, myeloid cell differentiation and Jak/STAT signaling. ***Cancer Immunology, Immunotherapy***, v. 63, n. 9, p. 889–900, 2014.

MAKSIMOVIC, J. J. D. et al. Profiling antioxidant activity of two primocane fruiting red raspberry cultivars ( Autumn bliss and Polka ). ***Journal of Food Composition and Analysis***, v. 31, p. 173–179, 2013.

NOH, H. J. et al. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of Citrus unshiu Hyung. ***Journal of Ethnopharmacology***, 2015.

NORATTO, G. D.; CHEW, B. P.; ATIENZA, L. M. Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) intake decreases oxidative stress in obese diabetic (db/db) mice. ***Food Chemistry***, v.227, p. 305–314, 2017.

PLESSI, M.; BERTELLI, D.; ALBASINI, A. Distribution of metals and phenolic compounds as a criterion to evaluate variety of berries and related jams. ***Food Chemistry***, v. 100, n. 1, p. 419–427, 2007.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. ***Comunicado técnico Embrapa***, p. 4, 2007. a.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. ***Comunicado técnico Embrapa***, p. 4, 2007. b.

SEGANTINI, D. M. et al. Chemical quality parameters and bioactive compound content of brazilian berries. ***Food Science and Technology (Campinas)***, v. 35, n. 3, p. 502–508, 2015.

SHI, Ni et al. Efficacy comparison of lyophilised black raspberries and combination of celecoxib and PBIT in prevention of carcinogen-induced oesophageal cancer in rats. ***Journal of Functional Foods***, v. 27, p. 84–94, 2016.

SHIN, J. S. et al. Anti-inflammatory effect of a standardized triterpenoid-rich fraction isolated from *Rubus coreanus* on dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and LPS-induced macrophages. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 158, n. PART A, p. 291–300, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with phosphomolybdic Phosphotungstic Acid Reagents. ***Americal Journal of Enology Viticulture***, v. 16, p. 144, 1965.

SOUSA, M. B. Framboesa: qualidade pós-colheita. ***Divulgação Agro 556***, v. 6, p. 35, 2007. b.

SUZUKI, K. et al. Assay Method for Myeloperoxidase in Human Polymorphonuclear Leukocytes. ***Analytical Biochemistry***, v. 132, n. 2, p. 345–352, 1983.

WARNER, B. M. et al. Chemoprevention of oral cancer by topical application of black raspberries on high at-risk mucosa. ***Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology***, v.

118, n. 6, p. 674–683, 2014.

XIÃO, T. Polyphenolic profile as well as anti-oxidant and anti-diabetes effects of extracts from freeze-dried black raspberries. **Journal of Functional Foods**, v. 31, p.179-187, 2017.

ZHAO, Y. et al. **Berry Fruit**. CRC Press. ed. Boca Raton. 2007.

ZHOU, L. et al. Enantiomeric 8- O -4 0 type neolignans from red raspberry as potential inhibitors of b -amyloid aggregation. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 322–329, 2017.

## 5. CONCLUSÃO

Através da realização deste trabalho foi possível fazer a caracterização de alguns compostos bioativos presentes nos *berries* estudados. Não foi possível identificar as cultivares com melhor potencial antioxidante, pois diferentes componentes da amostra podem ter apresentado maior afinidade de sequestrar o radical ABTS e outros mais eficientes para o radical DPPH. Ou seja, devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação.

No entanto, foi possível identificar para cada cultivar, o estágio de maturação onde o composto antioxidante de interesse encontra-se em maior quantidade. Bem como, correlacionar o efeito antioxidante com os compostos bioativos, mostrando que esta relação foi com o teor de CFT, ou seja, um efeito sinérgico dos compostos estudados.

Os extratos de amora cultivar 'Xavante' e framboesa cultivar 'Heritage', ambos no estágio maduro, aumentaram a viabilidade celular das células tratadas por 24h. Os extratos de amora e de framboesa nas concentrações (25, 50 e 100ug/mL) e (25, 50, 100, e 250ug/mL), respectivamente, não apresentaram danos oxidativos às células. Os extratos nas concentrações (25, 100 e 250ug/mL) amora e (50 e 100ug/mL) framboesa, também foram capazes de reduzir significativamente a atividade da enzima MPO. Ou seja, a amora-preta e a framboesa vermelha apresentaram potencial para uso terapêutico, sugerindo-se assim mais estudos *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos.** 1999.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão Phenolic compounds in foods – A brief review. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANTUNES, L. E. C. et al. Produção de amoreira-preta no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 100–111, 2014.
- AZEVEDO, M. L. De. **Perfil fitoquímico, atividades antioxidante e antimicrobiana de amoreira-preta (Rubus fruticosus) cv. Tupy em diferentes estádios de maturação cultivada em clima temperado.** Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Pelotas, 2011.
- BAGETTI, M. et al. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 147–154, 2011.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing (antioxidant) power as a measure of antioxidant capacity: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.
- BIBI, S. et al. Dietary red raspberries attenuate dextran sulfate sodium-induced acute colitis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 51, p. 40–46, 2018.
- BRADISH, C. M. et al. Comparison of Flavonoid Composition of Red Raspberries (*Rubus idaeus* L.) Grown in the Southern United States. **J. Agric Food Chem.**, v. 60, p. 5779–5786, 2012.
- BRASIL, Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. **PLANO DE AÇÕES ESTRATÉGICAS PARA O ENFRENTAMENTO DAS DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS (DCNT) NO BRASIL 2011-2022.** Brasília, 2011.
- CANUTO, G. A. B. et al. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196–1205, 2010.
- CARVALHO, E. et al. A targeted metabolomics approach to understand differences in flavonoid biosynthesis in red and yellow raspberries. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 79–86, 2013.
- CELANT, V. M. et al. Phenolic Composition and Antioxidant Capacity of Aqueous and Ethanolic Extracts of Blackberries. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 2, p. 1–8, 2016.
- CHEN, L. et al. Phytochemical properties and antioxidant capacities of various colored berries. **J Sci Food Agric**, v. 94, p. 180–188, 2013.
- CHEN, W. et al. Blackberry subjected to in vitro gastrointestinal digestion affords protection against Ethyl Carbamate-induced cytotoxicity. **Food Chemistry**, v. 212, p. 620–627, 2016. a.
- CHEN, W. et al. Protective effect of wild raspberry (*Rubus hirsutus* Thunb . ) extract against acrylamide-induced oxidative damage is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 196, p. 943–952, 2016. b.
- CHEN, W. et al. Wild Raspberry Subjected to Simulated Gastrointestinal Digestion Improves the Protective Capacity against Ethyl Carbamate-Induced Oxidative Damage in Caco-2 Cells.

**Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016. c.

CHITARRA, M. I.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e Hortaliças: glossário**. Ed. UFLA 256 p. 2006.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 48, n. 1, p. 8–19, 2011.

DE LIMA, V. L. A. G. et al. Flavonóides em seleções de acerola (*Malpighia* sp L.). 1-Teor de antocianinas e flavonóis totais. **Ciência Rural**, v. 30, n. 6, p. 1063–1064, 2000.

DE LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. de A.; LIMA, D. E. da S. Fenólogos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 447–450, 2002.

DE SOUZA, V. R. et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362–368, 2014.

DOS SANTOS, E. de O. L. **Mecanismo de ação de flavonoides no metabolismo oxidativo e na fagocitose de neutrófilos humanos desencadeados por receptores Fc gama e CR**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêutica, Ribeirão Preto, 2010.

EMBRAPA. Solos do Estado de Santa Catarina. n. 46, p. 745, 2004.

EVANS, J. L. et al. Pathways : A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 5, p. 599–622, 2002.

FERREIRA, D. S.; ROSSO, V. V. De; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 664–674, 2010.

FREIRE, J. M. et al. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. **Ciência Rural**, v. 43, n. 12, p. 2291–2295, 2013.

FU, Y. et al. LWT - Food Science and Technology Chemical composition and antioxidant activity of Chinese wild raspberry ( *Rubus hirsutus* Thunb.). **Food Science and Technology**, v. 60, p. 1262–1268, 2015.

FUKUI, M.; YAMABE, N.; ZHU, B. T. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 10, p. 1882–1891, 2010.

GARCIA, G. et al. Bioaccessible ( poly ) phenol metabolites from raspberry protect neural cells from oxidative stress and attenuate microglia activation. **Food Chemistry**, v. 215, p. 274–283, 2017.

GEORGÉ, S. et al. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **Society**, v. 53, n. 5, p. 1370–1373, 2005.

GIL-CHÁVEZ, G. J. et al. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients : An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. Harvey 2008, p. 5–23, 2013.

GOLDONI, J. **Caracterização físico-química, atividade antimicrobiana de frutos e germinação de Sete Capoteira [*Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG]**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal Da Fronteira Sul, Programa

de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental Erechim, 2017.

GOMES, F. Da S. Carotenóides: Uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutricao**, v. 20, n. 5, p. 537–548, 2007.

GROSSWEINER, L. I. Singlet oxygen: generation and properties. **Internet Photochemistry & Photobiology. Educational Articles**, 2007.

GUEDES, M. N. S. et al. Composição química, compostos bioativos e dissimilaridade genética entre cultivares de amoreira ( *Rubus spp.* ) cultivadas no Sul de Minas Gerais. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP**, v. 36, n. 1, p. 206–213, 2014.

GUEDES, M. N. S. et al. Antioxidant activity and total phenol content of blackberries cultivated in a highland tropical climate. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, n. 1, p. 43, 2017.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345–391, 2012.

HAEGELE, A. D. et al. Plasma Xanthophyll Carotenoids Correlate Inversely with Indices of Oxidative DNA Damage and Lipid Peroxidation 1. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 9, n. April, p. 421–425, 2000.

HASSIMOTTO, N. M. A. et al. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus sp.*) grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 702–708, 2008.

HIRSCH, G. E. **Valor nutricional e capacidade antioxidante de diferentes genótipos de amora-preta ( *Rubus sp.* )**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Santa Maria 2011.

HUSSAIN, I. et al. Phenology of “Tupy” and “Xavante” blackberries grown in a subtropical area. **Scientia Horticulturae**, v. 201, p. 78–83, 2016.

**ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHAMACEUTICALS FOR HUMAN USE: VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY - Q2(R1)**. 2005.

IM, S. et al. Anthocyanins in the ripe fruits of *Rubus coreanus* Miquel and their protective effect on neuronal PC-12 cells. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 604–610, 2013.

JACQUES, A. C. et al. Sanitização com produto à Base de cloro e com ozônio: Efeito sobre compostos bioativos de amora-preta (*rubus fruticosus*) cv. Tupy. **Revista Ceres**, v. 62, n. 6, p. 507–515, 2015.

JEONG, M. D. H. S. Effects of *Rubus occidentalis* extract on blood pressure in patients with prehypertension: Randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. **Nutrition**, v. 32, p. 461-467, 2016.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed.: Guanabara Koogan, 2012.

KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, Christine C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods in Enzymology**, v. 233, n. C, p. 502–512, 1994.

KITTS, D. D. An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. **Trends in Food Science and Technology, Cambridge**, v. 81, n. June, p. 198–203, 1997.

KNOBLOCH, T. J. et al. Suppression of proinflammatory and prosurvival biomarkers in oral cancer

- patients consuming a black raspberry phytochemical-rich troche. **Cancer Prevention Research**, v. 9, n. 2, p. 159–171, 2015.
- KONG, J. M. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923–933, 2003.
- KULA, M. et al. Phenolic composition of fruits from different cultivars of red and black raspberries grown in Poland. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 52, p. 74–82, 2016.
- KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726–732, 2005.
- LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004.
- LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScienc**, v. 7, n. 1, p. 83–84, 1972.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W.. Influência do meio de Amoreira-preta e Framboeseira. **Ciênc. agrotec.**, v. 34, n. 2, p. 352–360, 2010.
- LIMA, A. de J. B. et al. Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jaboticaba [Myrciaria cauliflora (Mart.) O. Berg]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 877–887, 2011.
- MACE, T. A. et al. Bioactive compounds or metabolites from black raspberries modulate T lymphocyte proliferation, myeloid cell differentiation and Jak/STAT signaling. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 63, n. 9, p. 889–900, 2014.
- MACEDO, T. A. De et al. Desenvolvimento de plantas de duas cultivares de framboeseira obtidas por estaca de raiz. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 11, n. 2, p. 158–161, 2012.
- MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, p. 33–39, 2008.
- MAJEWSKA-WLWRZBICKA, M.; CZECZOT, H. Flavonoids in the prevention and treatment of cardiovascular diseases. **Pol Merkur Lekarski**, v. 32, n. 187, p. 50–4, 2012.
- MAKSIMOVIC, J. J. D. et al. Profiling antioxidant activity of two primocane fruiting red raspberry cultivars ( Autumn bliss and Polka ). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, p. 173–179, 2013.
- MANGANARIS, George A. et al. Berry antioxidants: Small fruits providing large benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 5, p. 825–833, 2014.
- MILIVOJEVIĆ, J. et al. Classification and fingerprinting of different berries based on biochemical profiling and antioxidant capacity. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1285–1294, 2013.
- MOON, J.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 5, p. 1655–1666, 2009.
- MOURA, P. H. A. et al. Phenology and yield of raspberry cultivars in subtropical regions in Brazil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 47, n. 12, p. 1714–1721, 2012.
- NOH, H. J. et al. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of Citrus unshiu Hyung. **Journal of Ethnopharmacology**, 2015.
- NORATTO, G. D.; CHEW, B. P.; ATIENZA, L. M. Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) intake decreases oxidative stress in obese diabetic (db/db) mice. **Food Chemistry**, v.227, p. 305–314, 2017.

- NUSSBAUM, C. et al. Myeloperoxidase: A Leukocyte-Derived Protagonist of Inflammation and Cardiovascular Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 692–713, 2013.
- OLIVEIRA-CAMPOS, M. et al. Impacto dos fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis na qualidade de vida The impact of risk factors of non-communicable chronic diseases on quality of life. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 3, p. 873–882, 2013.
- OLIVEIRA, D. M. et al. Biodegradable coatings on the postharvest of blackberry stored under refrigeration. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 44, n. 2, p. 302–309, 2013.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do dpph: Estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.
- OU, B.; NEMZER, B. ORAC Using Multiple Radicals (ORAC-MR): New Horizons in Total Antioxidant Capacity Measurement. **Nutraceuticals World**, v. 17, n. 2, p. 50–53, 2014.
- PACHECO, S. M. **Frutos da família Myrtaceae: Caracterização físico química e potencial inibitório da atividade das enzimas digestivas**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Pelotas, 2015.
- PINELI, L. de L. de O. **Qualidade e potencial antioxidante *in vitro* de morangos *in natura* e submetidos a processamentos**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Brasília, 2009.p. 17–196, 2009.
- PLESSI, M.; BERTELLI, D.; ALBASINI, A. Distribution of metals and phenolic compounds as a criterion to evaluate variety of berries and related jams. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 419–427, 2007.
- PRIOR, R. L.; SINTARA, M.; CHANG, T. Multi-radical (ORACMR5) antioxidant capacity of selected berries and effects of food processing. **Journal of Berry Research**, v. 6, n. 2, p. 159–173, 2016.
- PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 797–810, 2015.
- PRIOR, R. L.; CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Elsevier B.V.**, v. 27, 1999.
- RASEIRA, M. do C. B.; FRANZON, C. R. Melhoramento genético e cultivares de amora-preta e mirtilo. **Informe Agropecuário, Belo horizonte**, v. 33, n. 268, p. 11–20, 2012.
- RODRIGUES – AMAYA, D. B. **Food carotenoids: chemistry, biology and technology**. 2016.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington, ILST. 64p., 2001.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. et al. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 6, p. 445–463, 2008.
- ROSA, J. S. Da et al. 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.
- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. **Comunicado técnico Embrapa**, p. 4, 2007. a.

- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado técnico Embrapa**, p. 4, 2007. b.
- RUTZ, J. K.; VOSS, G. B.; ZAMBIAZI, R. C. Influence of the Degree of Maturation on the Bioactive Compounds in Blackberry ( *Rubus spp.* ) cv . Tupy. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2012, n. October, p. 1453–1460, 2012.
- SEGANTINI, D. M. et al. Chemical quality parameters and bioactive compound content of brazilian berries. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 35, n. 3, p. 502–508, 2015.
- SHI, Ni et al. Efficacy comparison of lyophilised black raspberries and combination of celecoxib and PBIT in prevention of carcinogen-induced oesophageal cancer in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 84–94, 2016.
- SHIN, J. S. et al. Anti-inflammatory effect of a standardized triterpenoid-rich fraction isolated from *Rubus coreanus* on dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and LPS-induced macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, n. PART A, p. 291–300, 2014.
- SILVA, C. C.; FIGUEIREDO, P. S.; SOARES, M. D. Consumo de alimentos fontes em antioxidantes por indivíduos com doença cardiovascular. **Nutrição Brasil**, v. 15, n. 3, 2016.
- SILVA, R. S.; VENDRUSCOLO, J. L.; TORALLES, R. P. Valiação da capacidade antioxidante em frutas produzidas na região Sul do RS. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 17, n. 3–4, p. 392–400, 2011.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI JR, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with phosphomolybdic Phosphotungstic Acid Reagents. **Americal Journal of Enology Viticulture**, v. 16, p. 144, 1965.
- SOUSA, M. B. Amora:Qualidade pós-colheita. **Divulgação Agroo 556**. N, p. 1–31, 2007. a.
- SOUSA, M. B. Framboesa: qualidade pós-colheita. **Divulgação Agro 556**, v. 6, p. 35, 2007. b.
- SOUTINHO, S. M. et al. Evolução dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante durante a maturação de frutos vermelhos ( framboesa , groselha e mirtilo ) de produção biológica Evolution of phenols and antioxidant capacity during maturation of red fruits ( raspberry , blac. **VII Congresso Ibérico de Agroingenieria y Ciencias Hortícolas**, 2013.
- SRIVASTAVA, A. Nita et al. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Polyphenolics from Southeastern U . S . Range Blackberry Cultivars. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 10, p. 6102–6109, 2010.
- SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2012.
- SUZUKI, K. et al. Assay Method for Myeloperoxidase in Human Polymorphonuclear Leukocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 132, n. 2, p. 345–352, 1983.
- VIANA, S. D. et al. Transmissíveis Em Uma Feira De Saúde. **LifeStyle**, v. 3, n. 1, p. 13–33, 2016.
- VOLK, G. M. et al. The ASHS Outstanding Fruit Cultivar Award : **Hortscience**, v. 48, n. 1, p. 4–12, 2013.
- WARNER, B. M. et al. Chemoprevention of oral cancer by topical application of black raspberries on high at-risk mucosa. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 118, n. 6, p. 674–683, 2014.
- WISEMAN, H. ; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem J.**, v. 29, n. 2, p. 17–29, 1996.
- XIÃO, T. Polyphenolic profile as well as anti-oxidant and anti-diabetes effects of extracts from

freeze-dried black raspberries. **Journal of Functional Foods**, v. 31, p.179-187, 2017.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. **Chem. Rev.**, v. 111, p. 5944–5972, 2011.

ZHAO, Y. et al. **Berry Fruit**. CRC Press. ed. Boca Raton. 2007.

ZHOU, Le et al. Enantiomeric 8- O -4 0 type neolignans from red raspberry as potential inhibitors of b -amyloid aggregation. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 322–329, 2017.

ZIA-UL-HAQ, M. et al. *Rubus fruticosus* L.: Constituents, biological activities and health related uses. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 10998–11029, 2014.

ZIELINSK, A. A. F. et al. Blackberry (*Rubus* spp.): influence of ripening and processing on levels of phenolic compounds and antioxidant activity of the ‘Brazos’ and ‘Tupy’ varieties grown in Brazil. **Ciência Rural**, v. 45, n. 4, p. 744–749, 2015.

## ANEXO A

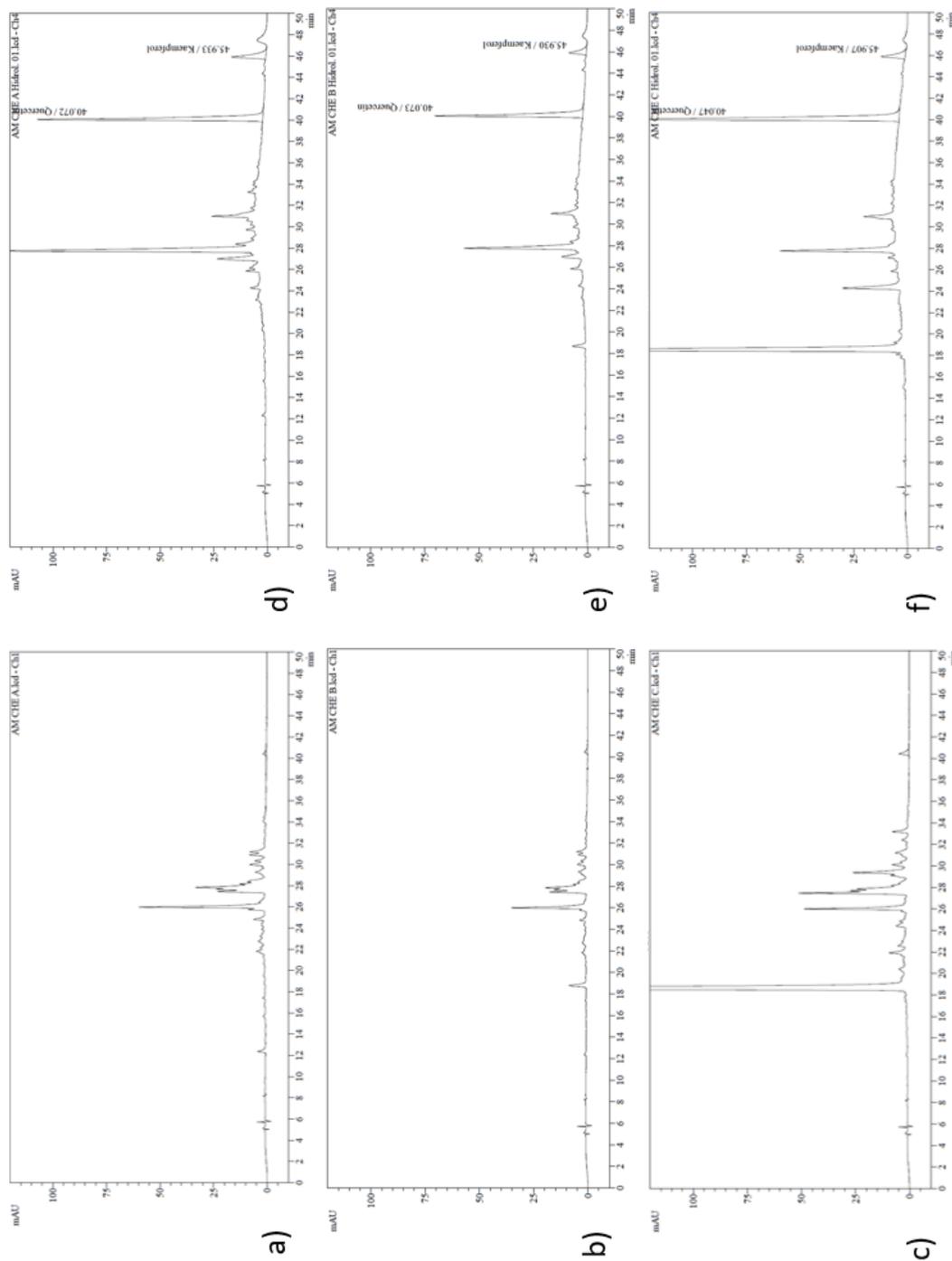


Figura 6 a) Amostra bruta de 'Cherokee' no estágio de maturação verde b) Amostra bruta de 'Cherokee' no estágio de maturação semi-maduro c) Amostra bruta de 'Cherokee' no estágio de maturação maduro d) Amostra hidrolisada de 'Cherokee' no estágio de maturação verde e) Amostra hidrolisada de 'Cherokee' no estágio de maturação semi-maduro f) Amostra hidrolisada de 'Cherokee' no estágio de maturação maduro.

## ANEXO B

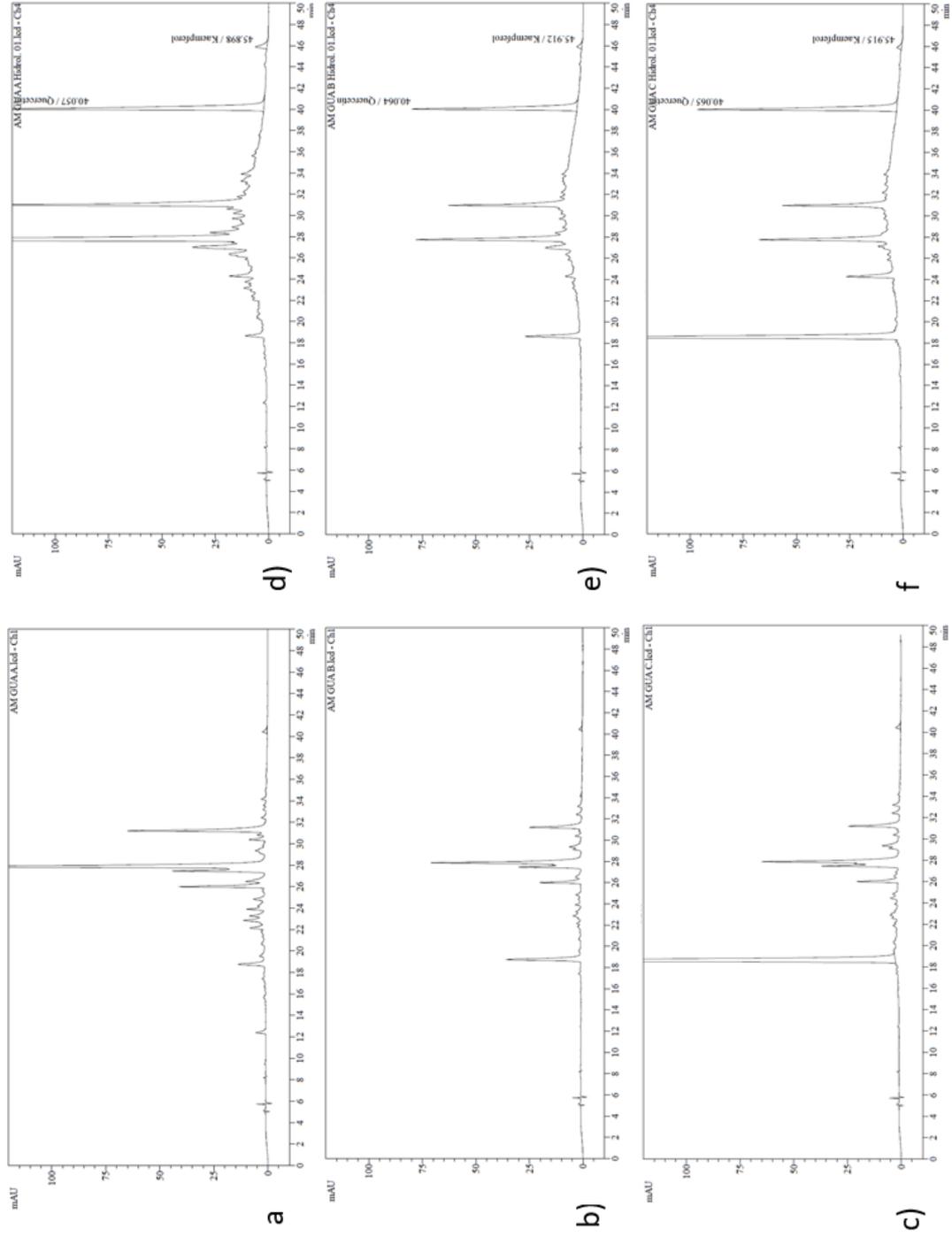


Figura 7 a) Amostra bruta de ‘Guarani’ no estágio de maturação verde b) Amostra bruta de ‘Guarani’ no estágio de maturação semi-maduro c) Amostra bruta de ‘Guarani’ no estágio de maturação maduro d) Amostra hidrolisada de ‘Guarani’ no estágio de maturação verde e) Amostra hidrolisada de ‘Guarani’ no estágio de maturação semi-maduro f) Amostra hidrolisada de ‘Guarani’ no estágio de maturação maduro.

## ANEXO C

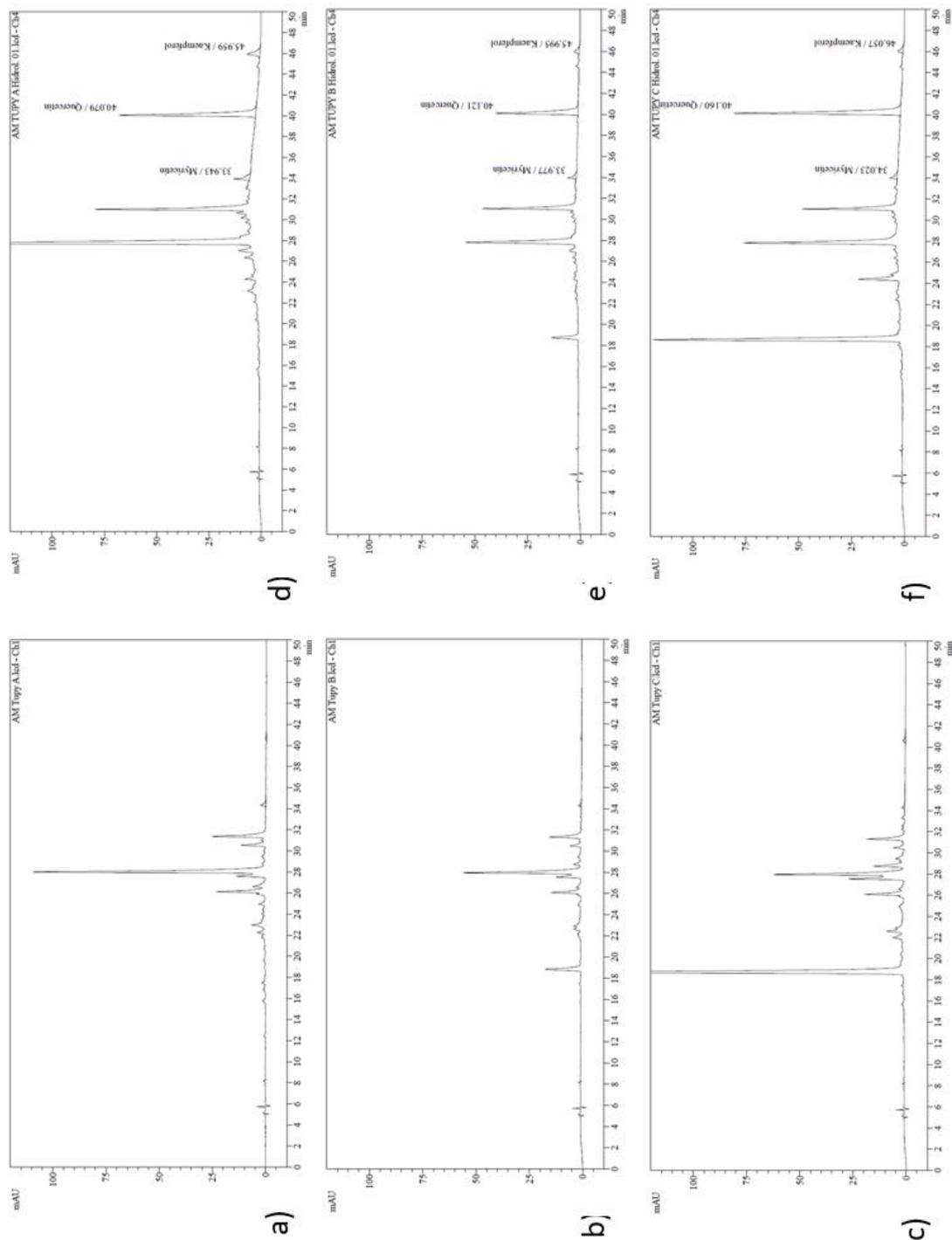


Figura 8 a) Amostra bruta de ‘Tupy’ no estágio de maturação verde b) Amostra bruta de ‘Tupy’ no estágio de maturação semi-maduro c) Amostra bruta de ‘Tupy’ no estágio de maturação maduro d) Amostra hidrolisada de ‘Tupy’ no estágio de maturação verde e) Amostra hidrolisada de ‘Tupy’ no estágio de maturação semi-maduro f) Amostra hidrolisada de ‘Tupy’ no estágio de maturação maduro.

## ANEXO D

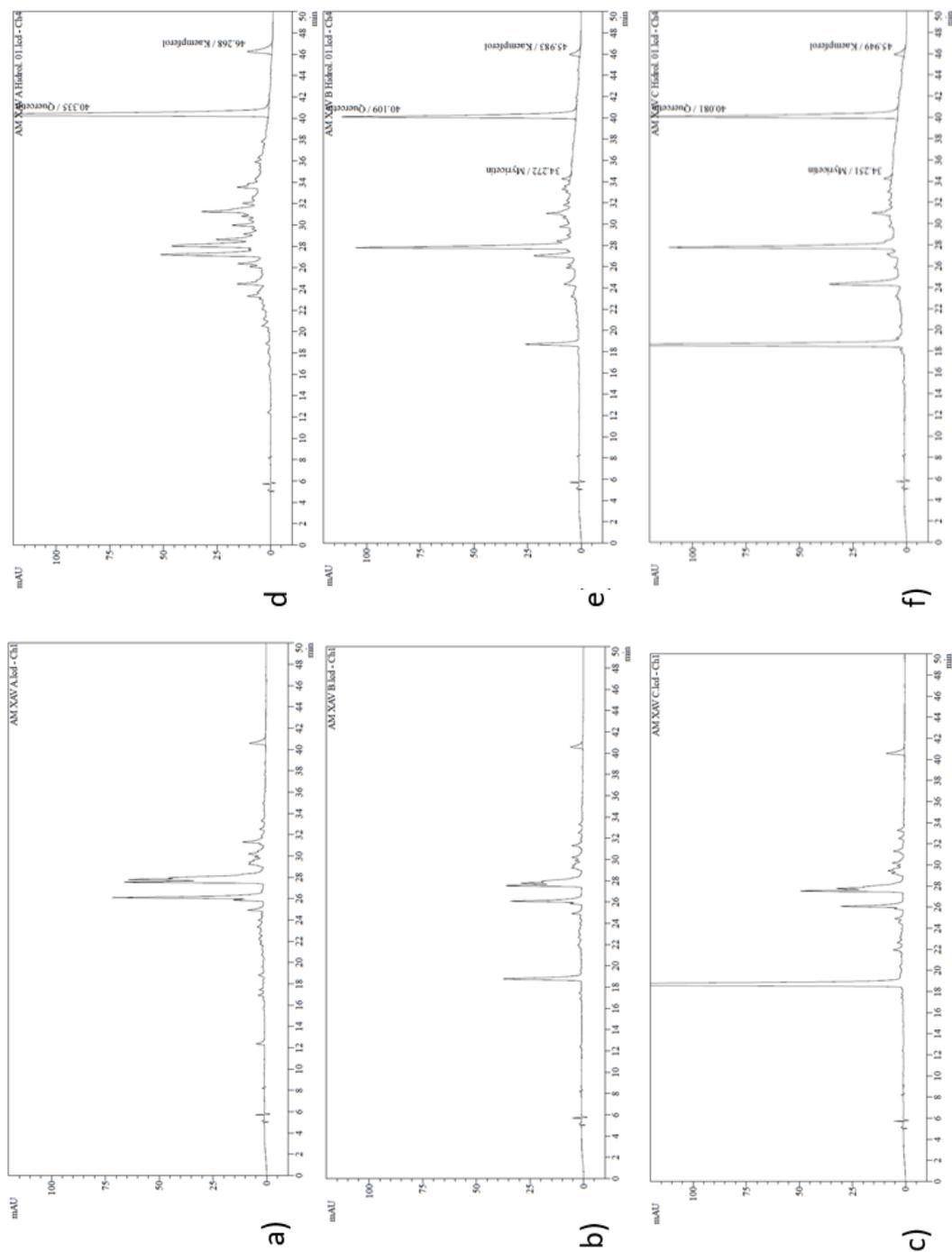


Figura 9 a) Amostra bruta de 'Xavante' no estágio de maturação verde b) Amostra bruta de 'Xavante' no estágio de maturação verde c) Amostra bruta de maturação maduro d) Amostra bruta de maturação maduro e) Amostra bruta de maturação maduro f) Amostra bruta de maturação maduro. Amostra hidrolisada de 'Xavante' no estágio de maturação verde e) Amostra hidrolisada de 'Xavante' no estágio de maturação verde f) Amostra hidrolisada de 'Xavante' no estágio de maturação verde.