

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
Agroindustrial



**ESTABILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM
POLPA CONGELADA DE AMORA-PRETA (*Rubus
fruticosus*) cv.TUPY**

**Andressa Carolina Jacques
Engenheira de Alimentos**

Pelotas, julho de 2009

ANDRESSA CAROLINA JACQUES
Engenheira de Alimentos

**ESTABILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM
POLPA CONGELADA DE AMORA-PRETA (*Rubus
fruticosus*) cv. TUPY**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pelotas, sob
orientação do Prof. Dr. Rui Carlos
Zambiasi, como parte das exigências
do Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia Agroindustrial da
Faculdade de Agronomia Eliseu
Maciel, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Ciências (área de concentração:
Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Orientador: Prof. PhD. Rui Carlos Zambiasi (DCA-UFPEL)
Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Josiane Freitas Chim (DCA- UFPEL)

PELOTAS
Rio Grande do Sul – Brasil
Julho 2009

Banca examinadora:

PROF. PhD. RUI CARLOS ZAMBIAZI (DCA/UFPeI) – ORIENTADOR

PROF^a. DR^a. JOSIANE FREITAS CHIM (DCA/UFPeI) – CO-ORIENTADORA

PROF. DR. VALDECIR CARLOS FERRI (DCA/UFPeI) – BANCA

PROF^a. DR^a MARCIA DE MELLO LUVIELMO (DCA/UFPeI) – BANCA

“É melhor tentar e falhar, do que preocupar-se e ver a vida passar,
“É melhor tentar ainda que em vão, do que sentar-se fazendo nada até o final,
Eu prefiro na chuva caminhar, do que em dias tristes em casa me esconder,
Eu prefiro ser feliz embora louco, do que em conformidade viver”

Martin Luther King

**Dedico este trabalho à minha família
por tudo aquilo que me representa**

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de vida e sabedoria;

À minha família, que é a base da minha vida: minha mãe Ângela, meu pai Luis Fernando e meu irmão Jeferson, pelo amor, incentivo e apoio incondicional ao longo dessa jornada;

Ao Éderson, meu companheiro que fez parte do início dessa trajetória, por tudo que me representa e pelo seu apoio e amor acima de tudo;

As minhas amigas (em especial as Luluzinhas) por todos os bons momentos, que de perto ou longe estão sempre torcendo pela minha vitória;

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

Ao Professor Rui Carlos Zambiasi, pelos conhecimentos adquiridos, pela paciência, confiança e amizade;

A minha co-orientadora Josiane Chim, pelos conselhos, ajuda na elaboração desta dissertação e sua amizade;

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pelo constante incentivo e ajudas valiosas;

Às gurias do laboratório de Cromatografia do DCTA, em especial Paula, Milene e Marla, que hoje passam de colegas de mestrado a grandes amigas, sendo seu apoio e amizade fundamentais para realização deste trabalho;

À todos os estagiários que passaram pelo laboratório de cromatografia pela disposição;

À Roberta Manica pela amizade e valiosa ajuda na parte estatística deste trabalho;

Por fim, agradeço ao Capes pelo apoio financeiro deste projeto.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO	ii
ÍNDICE DE TABELAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
Resumo	v
Abstract	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Pequenas frutas	2
2.2.1 Polpa de amora-preta	5
2.3 Fitoquímicos	6
2.3.1 Compostos fenólicos	6
2.3.2 Tocoferóis	10
2.3.3 Ácido ascórbico	11
2.3.4 Carotenóides	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Materiais	13
3.2 Métodos	14
3.2.1. Preparo da polpa e delineamento experimental	14
3.3 Determinações analíticas	15
3.3.1 Determinações físico-químicas gerais	15
3.3.2 Quantificação de fenóis totais	16
3.3.3 Identificação e quantificação de compostos fenólicos individuais	16
3.3.4 Quantificação de antocianinas totais	17
3.3.5 Identificação e quantificação do ácido L-ascórbico	18
3.3.6 Identificação e quantificação de tocoferóis	19
3.3.7 Quantificação de carotenóides totais	20
3.3.8 Identificação e quantificação de carotenóides individuais	21
3.3.9 Determinação da capacidade antioxidante	22
3.4 Análise Estatística	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Determinações físico-químicas gerais	22
4.2 Conteúdo total de compostos fenólicos e antociânicos	25
4.3 Conteúdo de compostos fenólicos individuais	28
4.4 Conteúdo de tocoferóis individuais	31
4.5 Conteúdo de ácido ascórbico	33
4.6 Conteúdo de carotenóides totais	35
5. CONCLUSÃO	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição físico-química da amora-preta cultivada Tupy	5
Tabela 2. Delineamento experimental	14
Tabela 3: Programa do gradiente de eluição utilizado na separação de compostos fenólicos individuais em amora-preta cv. Tupy.....	16
Tabela 4: Programa do gradiente de eluição utilizado na separação do ácido L-ascórbico em amora-preta cv Tupy	18
Tabela 5: Programa do gradiente de eluição utilizado na separação de tocoferóis em amora-preta cv. Tupy.....	20
Tabela 6: Programa do gradiente de eluição utilizado na separação de carotenóides individuais em amora-preta cv. Tupy.....	21
Tabela 7: Sólidos solúveis, acidez titulável e pH em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.....	22
4	
Tabela 8: Compostos fenólicos e antocianícos totais em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.....	27
7	
Tabela 9: Fenóis Individuais em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento	30
Tabela 10: Tocoferóis em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.....	32
Tabela 11: Ácido ascórbico em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.....	34
Tabela 12: Carotenóides totais em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.....	36
Tabela 13: Carotenóides Individuais em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.....	39
Tabela 14: Capacidade Antioxidante em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.....	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1- Amora Preta cv. Tupy	4
Figura 2- Estrutura básica dos flavanóides.	7
Figura 3-Estrutura química do ácido gálico (a), ácido elágico (b) e ácido p-hidróxibenzóico (c)	7
Figura 4- Estrutura química do ácido caféico (a) e do ácido p-cumárico (b)	8
Figura 5- Estrutura química do trans resveratrol (a) e do cis-resveratrol (b)	8
Figura 6- Estrutura química da cianidina-3-glicosídeo (a) e da cianidina-3-rutinosídeo (b).	10
Figura 7- α-tocoferol (a); β-tocoferol (b); γ-tocoferol (c); e δ- tocoferol (d).	11
Figura 8- Oxi-redução do ácido L-ascórbico	12
Figura 9- Cromatograma de compostos fenólicos em amora-preta cv. Tupy....	28
Figura 10- Cromatograma de tocoferóis em amora-preta cv. Tupy	31
Figura 11- Cromatograma da vitamina C.em amora-preta cv. Tupy	33
Figura 12- Cromatograma dos carot. individuais em amora-preta cv. Tupy.....	37

JACQUES, Andressa C. ESTABILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM POLPA CONGELADA DE AMORA-PRETA (*Rubus fruticosus*) cv.TUPY. 2009. 49f. Dissertação (mestrado)- Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Resumo

O Brasil é considerado um dos principais países consumidores de frutas, ocupando a terceira posição mundial. A diversidade de frutas destinadas ao mercado é cada vez maior, mas suas propriedades e atividades não estão totalmente determinadas. No entanto, a partir do início da década de 90, a grande oferta de frutas vem justificando estudos direcionados ao desenvolvimento de novos produtos, que, na maioria das vezes, concentra na fruta “in natura” e na polpa suas maiores formas de consumo. Este trabalho teve por objetivo elaborar polpa de amora-preta da cultivar Tupy, e armazená-la sob diferentes condições de temperaturas (-10, -18 e -80 °C) durante 6 meses, e avaliar a estabilidade de seus principais fitoquímicos após o processamento e durante o período de armazenamento. Os resultados demonstraram que a temperatura de -10°C foi suficiente para não causar alterações significativas com relação à fenóis totais, antocianinas totais, capacidade antioxidante e acidez titulável (2 meses). A temperatura de -18°C foi suficiente para não causar alterações significativas nas polpas com relação à: fenóis totais e capacidade antioxidante (4 meses), antocianinas totais (2 meses) e β-caroteno (6 meses). Na temperatura de -80°C, poucas foram as alterações causadas na polpa armazenada por 6 meses, sendo observado apenas pequenas alterações em sólidos solúveis, ácido hidroxibenzoico. Nos carotenóides totais e individuais nenhuma das três temperaturas foi suficiente para evitar as perdas. Nos tocoferóis, apenas na polpa armazenada a -80°C por 2 meses não houve alteração. E o ácido ascórbico foi totalmente degradado nos 6 meses de armazenamento nas duas temperaturas (-10 e -18°C). Os compostos que mais contribuíram para o poder antioxidante da amora-preta cv. Tupy foram os compostos fenólicos.

Palavras-chave: amora-preta, polpa, estabilidade, fitoquímicos

JACQUES, Andressa C. Stability of bioactive compounds in frozen pulp of blackberry (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy 2009. 49f. Dissertação (mestrado)- Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Abstract

Brazil is considered one of the major consumer's country of fruits, occupying the third worldwide position. The diversity of fruit for the market is growing, but their properties and activities are not fully determined. However, from the beginning of the 90s, a large fruit supply is justifying studies related to the development of new products, which in most cases concentrates the major consumption form as raw fruit or pulp. This work aimed to produce pulp from blackberry cv. Tupy, and store it under different temperature conditions (-10, -18 and -80 °C) for 6 months, evaluating the stability of its main phytochemicals after processing and during the storage period. The results showed that the temperature of -10 °C was not sufficient to cause significant changes in relation to total phenols, total anthocyanins, antioxidant capacity and titrable acidity (2 months). The temperature of -18 °C was not sufficient to cause significant changes in the pulp with respect to: total phenols and antioxidant capacity (4 months), total anthocyanins (2 months) and β -carotene (6 months). At temperature of -80 °C, few changes were caused in the pulp stored for 6 months, and observed only small changes in soluble solids, hydroxybenzoic acid. Total and individual carotenoids in any of the three IPF temperatures sufficient to avoid losses. In Tocopherol, only in the pulp stored at -80 °C for 2 months there was no change. The ascorbic acid was completely degraded within 6 months of storage at all temperatures (-10, -18 and -80 °C). The phenolics were the compounds that most contributed to the antioxidant capacity of blackberry cv. Tupy.

Key words: blackberry, pulp, stability, phytochemicals.

1 INTRODUÇÃO

A mudança no hábito alimentar da população brasileira, observada nos últimos anos, tem proporcionado um novo nicho de mercado de frutas frescas. A produção brasileira das principais espécies frutíferas de clima temperado é insuficiente para atender a demanda interna, gerando uma crescente necessidade de importação de frutas que, a princípio, poderiam ser produzidas no Brasil.

Dentre as opções de espécies frutíferas com perspectivas de comercialização, surge a amoreira-preta (*Rubus spp*), como uma das mais promissoras. Esta é uma das espécies que tem apresentado um crescimento de área cultivada nos últimos anos no Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro), mas apresenta alto potencial de cultivo em regiões de clima temperado e subtropical, como Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Sul de Minas Gerais. Devido ao baixo custo de implantação e manutenção do pomar e, principalmente, à reduzida utilização de defensivos agrícolas, esta cultura se apresenta como opção para a agricultura familiar. O cultivo da amoreira-preta caracteriza-se pelo retorno rápido, pois no segundo ano de plantio inicia a produção, proporcionando ao pequeno produtor opções de renda, pela destinação do produto ao mercado “in natura”, e também como matéria-prima para indústrias processadoras de alimentos, como indústrias de produtos lácteos, de congelados e conserveiras. Essa fruta apresenta ampla aplicação para a fabricação de geléias e sucos caseiros que, com o potencial do ecoturismo regional, torna-se bastante atrativo para a agregação de valor ao produtor (ANTUNES; RASSEIRA, 2004).

A amora-preta, devido a sua fisiologia e metabolismo (alta produção de etileno), é uma fruta que apresenta alta perecibilidade, e por isso, seu aproveitamento em grande escala é preferencialmente industrial. Entretanto, há pouca informação na literatura sobre o efeito do armazenamento e no processamento na composição química de processados a partir destas frutas. A fruta “in natura” é altamente nutritiva, contém em sua composição 85% de água, 10% de carboidratos, elevado conteúdo de minerais, vitaminas do complexo B e A e cálcio, além de ser fonte de compostos funcionais, como ácido elágico e antocianinas (MOTA, 2006).

Além dos nutrientes essenciais e dos micronutrientes, as frutas contribuem com diversos componentes oriundos de metabólicos secundários, principalmente os

de natureza fenólica, denominados de polifenóis. O consumo de frutas e hortaliças é associado com baixo risco de incidência e mortalidade por câncer e doenças cardíacas, devido a presença destes compostos oriundos do metabolismo secundário, especialmente flavonóides e antocianinas, os quais revelam grande capacidade de reagir com radicais livres que causam estresse oxidativo, e portanto, contribuem na prevenção de doenças cardiovasculares, circulatórias, neurológicas e cancerígenas. Estes compostos apresentam ainda, atividade anti-inflamatória, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana e antineoplásica (KUSKOSKI et al., 2005).

Em razão da produção concentrada nos meses de novembro a fevereiro e a rápida perda de qualidade pós-colheita, há uma grande limitação quanto ao fornecimento das frutas no mercado "in natura". Uma alternativa viável para o aproveitamento econômico dessas frutas consiste em sua industrialização, podendo ser congeladas, enlatadas, processadas na forma de polpa (como matéria-prima ou aditivo de cor e sabor), ou na forma de sucos e geléias (MOTA, 2006).

Além do fator nutricional, a conveniência continua conduzindo forças aos desejos dos consumidores. A conveniência, quando atribuída aos alimentos, relaciona-se com a facilidade de estocagem e de preparo para o consumo doméstico (SGARBIERI, 1986). A utilização da polpa de frutas congeladas está em expansão nas indústrias de produtos lácteos, de sorvetes, doces, etc., o que aumenta o interesse dos produtores e dos consumidores (KUSKOSKI et al., 2006).

Em face disto, este trabalho teve por objetivo elaborar polpa de amora-preta da cultivar Tupy, e armazená-la sob diferentes condições de temperaturas (-10, -18 e -80 °C) durante 6 meses, e avaliar a estabilidade de seus principais fitoquímicos após o processamento e durante o período de armazenamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pequenas frutas

As pequenas frutas constituem uma fonte natural de substâncias que exercem ação antioxidante. Extratos de várias frutas, como amora-preta, pitanga, groselha, mirtilo e framboesa, tem sido considerados eficazes no combate aos radicais livres (PANTELIDIS et al., 2006). Recentemente, devido a associação de

pequenas frutas à propriedades bioativas, tais como elevados teores de substâncias antioxidantes e anti-cancerígenas, tem aumentado a demanda de consumo de frutas pela população, em busca da suplementação alimentar a partir da diversificação da dieta com base em frutas.

A designação de “pequenas frutas” ou *small fruit*, é utilizada na literatura internacional para referenciar diversas culturas, como a do morangueiro, da amoreira-preta, da framboeseira, da groselheira, do mirtilheiro, entre outros. De acordo com Pagot e Hoffmann (2003), o cultivo de pequenas frutas tem despertado a atenção, não somente dos consumidores, mas o interesse por parte de produtores e comerciantes. De um modo geral, o cultivo destas espécies se caracteriza pelo baixo custo de implantação, custo de produção acessível aos pequenos produtores, retorno econômico, adaptação às condições sócio-econômicas e do ambiente local, exigência de mão-de-obra não qualificada, possibilidade de cultivo no sistema orgânico e demanda maior do que a oferta (POLTRONIERI, 2003).

Segundo Poltronieri (2003), o cultivo de pequenas frutas vem colaborando para a melhoria da qualidade de vida de muitas famílias do meio rural da região dos Campos de Cima da Serra, que abrange municípios de Vacaria, Monte Alegre dos Campos, Bom Jesus, Cambará do Sul, Jaquirana, São Francisco de Paula e São José dos Ausentes, e poderá, num futuro próximo, contribuir para o desenvolvimento desta região, principalmente em relação as propriedades de agricultores familiares descapitalizados.

Segundo Antunes (2002), dentre as várias opções de espécies frutíferas com perspectivas de cultivo e comercialização, tem-se a amoreira-preta (*Rubus* sp) como uma das mais promissoras. A amora-preta é uma das espécies que tem apresentado sensível crescimento de área cultivada nos últimos anos no Rio Grande do Sul, sendo hoje o estado de maior produção nacional, com aproximadamente 700 t.ano⁻¹; no entanto, a amoreira apresenta potencial de cultivo em outros estados de características climáticas semelhantes às do Rio Grande do Sul.

2.2 Amora-preta

A amora-preta (*blackberry*) pertence ao gênero *Rubus* que contém, aproximadamente, 740 espécies divididas segundo alguns autores, em 12 a 15 subgêneros (JENNINGS, 1988, *apud* DAUBENY, 1996). Esta frutífera possui porte

ereto ou rasteiro, que produz frutos agregados, formado por minidrupas com cerca de quatro a sete gramas, de coloração negra e sabor ácido a doce-ácido. É uma planta rústica que apresenta baixo custo de produção, facilidade de manejo, requer pouca utilização de defensivos agrícolas, sendo, por isso, uma alternativa promissora para cultivo na agricultura familiar (MOTA, 2006).

O cultivo da amora-preta começou na segunda metade do século XIX nos Estados Unidos, onde é conhecida como *blackberry*. No Brasil, as primeiras culturas foram introduzidas em 1972, no Centro de Pesquisa da Embrapa Clima Temperado, localizada em Pelotas-RS. Esta cultura apresentou boa adaptação e tem alcançado alta produtividade devido as condições climáticas desta região, a qual permite o cultivo de frutas das espécies de clima temperado (ANTUNES, 2002, ANTUNES e RASEIRA, 2004, NACHTIGALL et al., 2004). Além das cultivares inicialmente introduzidas, Brazos, Comanche e Cherokee, a Embrapa Clima Temperado desenvolveu um programa de melhoramento genético originando as cultivares Ébano, Negrita, Tupy, Guarani, Cainguangue e Xavante (SANTOS; RASEIRA; MADAIL, 1997).

Segundo relatos de Chim (2008), atualmente a cultivar Tupy (Fig.1) é mais plantada no Brasil, a qual resultou do cruzamento das cultivares Uruguai e Comanche, realizado pela Embrapa Clima Temperado em 1982. A colheita destas frutas ocorre entre meados de novembro a início de janeiro.



Figura 1 - Amora Preta cv. Tupy

Fonte: JAQUES, A.C., 2008.

As plantas desta espécie são de porte ereto, vigorosas e com espinhos, e seus frutos apresentam de 7 a 9 g de peso médio, sabor equilibrado (acidez/açúcar), consistência firme, película resistente e com teor de sólidos solúveis entre 8 a 9 °Brix (tab. 1).

Tabela 1 - Composição físico-química da amora-preta cultivar Tupy

Amora-preta cv Tupy	pH	Sólidos solúveis °B	Acidez (% ácido cítrico)	Carboidratos (%)	Umidade (%)
	3,23	8 e 9	1,33	4,72	91,37

Fonte: Mota, 2006.

2.2.1 Polpa de amora-preta

A amora-preta possui alta taxa respiratória e com isso sua vida de prateleira para consumo “in natura” é muito reduzida; portanto, a utilização desta fruta na forma de polpa congelada é uma alternativa para o consumo.

A indústria de polpas congeladas de frutas tem se expandido nos últimos anos. As unidades fabris se compõem, em sua maioria, de pequenos produtores, onde grande parte deles utilizam processos artesanais, sem a devida observância das técnicas adequadas de processamento (OLIVEIRA et al., 1999).

De acordo com Oliveira et al. (1999), a polpa congelada, por apresentar características de praticidade, vem ganhando grande popularidade, não só entre os consumidores caseiros, mas também em restaurantes, hotéis, lanchonetes, hospitais, etc., onde é utilizada, principalmente, na elaboração de sucos.

Frutas e hortaliças são potenciais veiculadores de microrganismos que podem estar associados a toxinfecções alimentares e, conseqüentemente, a doenças transmitidas por alimentos (DTA). Inúmeras são as causas para a presença de elevada carga microbiana nesse tipo de produto, entre as quais estão as técnicas de cultivo, a prática do uso de adubo orgânico, a utilização de águas contaminadas para irrigação, o transporte realizado em engradados abertos, armazenamento, distribuição para consumo, e as condições de higiene no manuseio e preparo das refeições, principalmente quando os alimentos são consumidos crus (PACHECO et

al., 2002). Portanto, uma das etapas de preparo de frutas para a elaboração de polpas consiste na sanitização das frutas.

Sanitizantes contendo compostos a base de cloro, incluindo hipoclorito de sódio e de cálcio, são amplamente utilizados em várias etapas do processamento de alimentos. Estes compostos são comumente adicionados a água para lavagem de alimentos crus, na água de limpeza e sanitização de equipamentos e na água utilizada no resfriamento de enlatados (BANWART, 1989). O cloro, especialmente na forma de sal de hipoclorito, é empregado para o controle bacteriológico em indústrias de frutas e hortaliças; porém, alguns fatores como concentração de cloro ativo da solução e o tempo de ação do sanitizante são determinantes para a eficácia do efeito antimicrobiano do produto (BANWART, 1989, ANDRADE; MARTYN, 1996).

2.3 Fitoquímicos

As frutas contêm diferentes fitoquímicos, e muitos deles exibem capacidade antioxidativa. De acordo com Speirs e Brady (1991), o amadurecimento de frutas envolve uma série de complexas reações bioquímicas, como a hidrólise do amido, a produção de carotenóides, de antocianinas e de compostos fenólicos, além da formação de vários compostos voláteis.

Recentes publicações relatam as propriedades de vários fitoquímicos, especialmente dos compostos fenólicos presentes em frutas, os quais atuam com eficácia contra infecções causadas por *Helicobacter pylori* e na prevenção de diversas doenças (VATTEM, 2005). Dentre os principais fitoquímicos que apresentariam estas propriedades destacam-se os compostos fenólicos, os tocoferóis e o ácido ascórbico.

2.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos presentes nas fontes vegetais são classificados como flavonóides e não flavonóides, sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e hortaliças. Os flavonóides são os compostos que apresentam a estrutura química descrita como C₆-C₃-C₆ (Fig. 2).

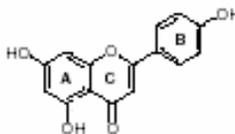


Figura 2 - Estrutura básica dos flavanóides.

Fonte: Skerget, Kotnink e Hadolin, 2005.

Os compostos não flavonóides incluem (MELO e GUERRA, 2002, BURNS, 2001):

a) os derivados das estruturas químicas C_6-C_1 - compostos hidroxibenzoicos, como os representados pelos ácidos p-hidroxibenzoico, gálico e elágico (Fig. 3).

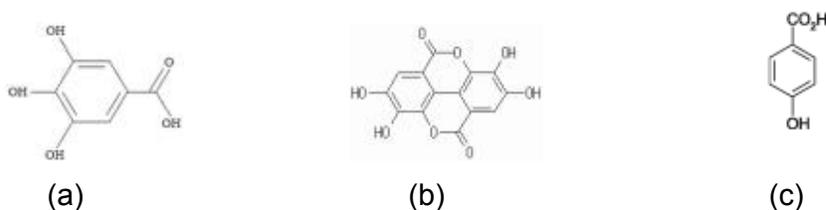


Figura 3 - Estrutura química do ácido gálico (a), ácido elágico (b) e ácido p-hidroxibenzoico (c)

Fonte: Malacrida e Motta, 2006.

b) os derivados das estruturas químicas C_6-C_3 - compostos hidroxicinâmicos, representados pelos ácidos caféico e p-cumárico (fig.4).

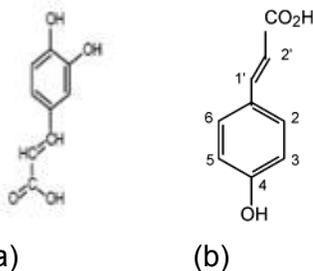


Figura 4 - Estrutura química do ácido caféico (a) e do ácido p-cumárico (b)

Fonte: Filho, Pereira e Bayma, 2005.

c) e os derivados das estruturas químicas $C_6-C_2-C_6$ - que são específicas do trans- e do cis- resveratrol (Fig.5).

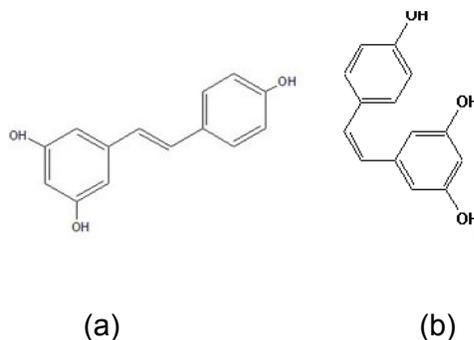


Figura 5 - Estrutura química do trans resveratrol (a) e do cis-resveratrol (b)

Fonte: Filho, Pereira e Bayma, 2005

A presença e distribuição dos flavonóides nos vegetais depende de fatores como ordem e família do vegetal, bem como da variação das espécies. Os flavonóides são formados a partir da combinação de derivados sintetizados a partir da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético. Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente de raios ultravioleta, pois a formação dos flavonóides é acelerada pela luz. Consequentemente, em plantas cultivadas em estufas, onde os raios ultravioleta são bloqueados, o conteúdo de flavonóides é reduzido; assim como os vegetais que crescem na Espanha ou na África do Sul são apontados como contendo de 4 a 5 vezes mais flavonóides que os que crescem no Reino Unido (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004). O frio é fator importante durante o período de dormência, para proporcionar um bom índice de brotação. Mas, se ocorrer fora dessa fase, pode causar sérios danos às gemas, flores e frutos em desenvolvimento, principalmente devido as geadas tardias de primavera. Durante a fase vegetativa, a temperatura e a precipitação influem na qualidade das gemas, fator determinante do potencial de produção para o ano seguinte (ANTUNES; RASEIRA, 2004).

A amora-preta, de modo geral, por ser uma planta de clima temperado é resistente à geada,. Diferente das demais espécies de pequenas frutas, apresenta cultivares com boa adaptação às condições climáticas do Sul do Brasil, desenvolvidas através de melhoramento genético na Embrapa (Pelotas-RS) a partir de cultivares que apresentam adaptação a altas temperaturas no verão e menor necessidade de horas de frio no inverno (ANTUNES; RASEIRA, 2004).

A variação de temperatura entre o dia e a noite em algumas regiões no Sul do Brasil é grande, geralmente maior que 10°C, principalmente na primavera e no outono, quando ocorrem ainda temperaturas baixas. A amplitude térmica, associada a temperaturas baixas, é importante para conferir coloração e equilíbrio de acidez e açúcar na amora, características importantes para o sabor da fruta consumida na forma “in natura” (ANTUNES; RASEIRA, 2004).

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

Atualmente se conhece cerca de 20 tipos de antocianinas, mas apenas 6 são encontradas em maiores proporções em vegetais: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina. As demais antocianinas são relativamente raras e são normalmente encontradas apenas em algumas flores e folhas (FENNEMA, 1993).

Dentre as principais antocianinas presentes em “pequenas frutas” estão incluídas a cianidina-3-glucosídeo (Fig. 6a), cianidina-3-rutinosídeo (Fig. 6b), delphinidina-3-glucosídeo, delphinidina-3-rutinosídeo e pequenas quantidades de pelargonidina-3-rutinosídeo, malvidina e peonidina-3-rutinosídeos (DAO; TAKEOKA; EDWARDS, 1998).

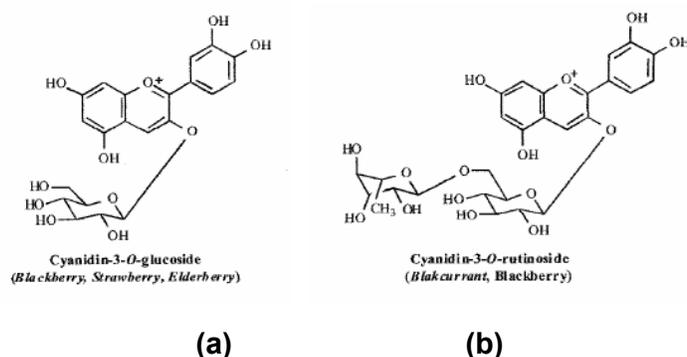


Figura 6 - Estrutura química da cianidina-3-glicosídeo (a) e da cianidina-3-rutinosídeo (b).

Fonte: Beattie; Crozier & Duthie, 2005.

2.3.2 Tocoferóis

A vitamina E consiste na denominação genérica de oito compostos lipossolúveis, o alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ)-tocoferóis, além do α , β , γ e δ -tocotrienóis, cada um com atividades biológicas específicas; porém, o α -tocoferol é o composto que apresenta maior atividade como antioxidante (BIANCHINI e PENTEADO, 2003, BALL, 1998).

Os tocoferóis (Fig.7) ocorrem naturalmente em praticamente todos os vegetais, principalmente nos vegetais verde-escuros, nas sementes oleaginosas, nos óleos vegetais e no germem de trigo. Os tocotrienóis são encontrados apenas em um pequeno grupo de vegetais, como em algumas variedades de palma. A ocorrência natural dos diferentes compostos que fazem parte da vitamina E diferenciam-se entre os vegetais, mas o α -tocoferol tem ocorrência mais comum (SETIADIA, 2003).

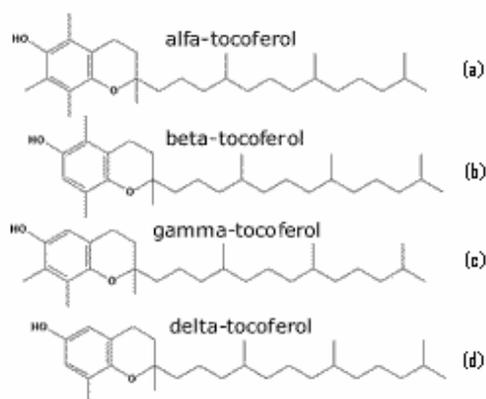


Figura 7 - α -tocoferol (a); β -tocoferol (b); γ -tocoferol (c); e δ - tocoferol (d).

Fonte: Vitamina E, 2005.

A rota da vitamina E no organismo pode ser explicada, em linhas gerais, como um antioxidante lipídico na estabilização de membranas subcelulares; no entanto, se tem observado que participam também de outras atividades vitamínicas (DÍAZ, 2007; SIQUEIRA, 1997). A sua função como antioxidante na peroxidação das membranas celulares ocorre pelo fornecimento de um átomo de hidrogênio ao radical peróxido formado, agindo como seqüestrante de radicais livres, protegendo assim as membranas celulares de possíveis danos (SIQUEIRA, 1997).

A vitamina E apresenta pouca resistência ao aquecimento e a ação de ácidos, sendo instável a ação de agentes alcalinos, da luz ultravioleta e do oxigênio. Essa vitamina é destruída quando em contato com gorduras rançosas, e com os metais chumbo e ferro. Como são insolúveis em água, não há perda por extração na cocção (RICE-EVANS; MILLER, 1995; SIQUEIRA, 1997).

2.3.3 Ácido ascórbico

A vitamina C ou ácido L-ascórbico (AA), é uma vitamina hidrossolúvel e termolábil. O AA é amplamente distribuído nos vegetais e em produtos de origem vegetal, sendo encontrado, principalmente, em frutas cítricas e hortaliças folhosas (ZHANG; HAMAUZU, 2004).

O AA encontra-se na natureza sob a forma reduzida, denominada de ácido L-ascórbico, ou oxidada na forma de ácido L-dehidroascórbico (DHA), porém, a forma oxidada está menos difundida nas substâncias naturais e

representa o produto primário do processo de oxidação do anel lactona do ácido L-ascórbico. A transformação do AA em DHA ocorre normalmente no interior do organismo, e como é reversível, permite que uma destas formas possa ser transformada na outra. Essa capacidade de conversão atua como um sistema oxido-redutor, que é capaz de transportar hidrogênio no processo de respiração ao nível celular (WELCH, 1995 e TAVARES et al., 2000).

O ácido L-dehidroascórbico (DHA) também apresenta atividade vitamínica, pois é facilmente reduzido no organismo, e apresenta cerca de 80% da atividade vitamínica do AA. O processo de oxidação é reversível, que devido à perda de dois elétrons, leva ao ácido L-dehidroascórbico (fig.8). A atividade antioxidante da vitamina C envolve a doação de um elétron e a formação do radical livre ascorbato (ROSA et al., 2007).

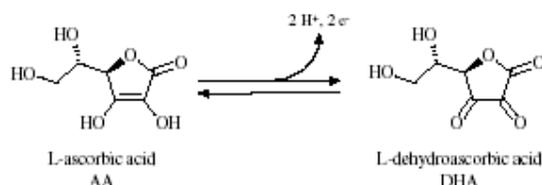


Figura 8 - Oxi-redução do ácido L-ascórbico

Fonte: Silva, et al., 2006.

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

2.3.4 Carotenóides

Os carotenóides constituem um dos mais importantes grupos de pigmentos na natureza, devido às suas numerosas funções, larga distribuição e diversidade estrutural (OLIVER; PALOU, 2000). Uma das suas principais funções é a atividade provitamínica A. A vitamina A é essencial para a diferenciação celular, a visão, o crescimento ósseo, a reprodução e a integração do sistema imunológico, sendo que sua deficiência resulta em anemia (LAYRISSE, 2000).

Os carotenóides compreendem uma família de compostos naturais, dos quais mais de 600 variantes estruturais estão reportadas e caracterizadas, a partir de bactérias, algas, fungos e plantas superiores. (FONTANA, 1997). São pigmentos comumente encontrados em alimentos de origem vegetal e os responsáveis pelas colorações amarela, alaranjada e vermelha. Também ocorrem em vegetais folhosos, mas estes apresentam coloração verde pois a clorofila (pigmento desta cor) é mais forte e predominante (CTENAS, 2000).

A estrutura química dos carotenóides é baseada em uma cadeia de carbonos com a presença de ligações duplas, compartilhadas ou não. Estas ligações duplas características fazem desses compostos potenciais antioxidantes, uma vez que suas moléculas são capazes de receber elétrons de espécies reativas, neutralizando os radicais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

Foram utilizadas frutas de amora-preta (*Rubus fruticosus*), da cultivar Tupy, cultivadas na cidade de Morro Redondo-RS e colhidas no período de janeiro de 2008. As amoras foram colhidas no período da manhã, em seu estágio apropriado de maturação (determinado pelo aspecto visual de coloração e em torno de 10°Brix) e levadas ao laboratório de cromatografia do DCTA/UFPeI, sob refrigeração em caixas de isopor contendo gelo e embaladas em sacos plásticos.

Os padrões cromatográficos para a determinação de Fenóis foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO) e Fluka (Milwaukee, WI), sendo eles: ácidos hidroxicinâmicos: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico; ácidos hidroxibenzóicos: ácido gálico, ácido elágico, ácido p-hidroxibenzóico; flavonóis: quercetina, kaempferol, miricetina e flavanóis: catequina, epicatequina, todos com 96-99% de pureza. Os padrões utilizados para a determinação de Tocoferóis foram: α -, δ - e γ -tocoferol, obtidos da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) com 90-99% de pureza. Para a determinação de Carotenóides utilizou-se padrões de β -cryptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina, obtidos da Chromadex (Irvine, USA), e β -caroteno obtido da Fluka (Saint Louse, USA), todos com 97% de pureza. Os padrões cromatográficos para a determinação de ácido ascórbico foram: ácido L-(+)-

ascórbico da Synth (Diadema, Brazil), 99% de pureza, e ácido L-(+)-dehidroascórbico da Fluka (Saint Louse, USA) com pureza superior a 80%. Os reagentes para as demais análises foram de grau p.a.

3.2 Métodos

3.2.1. Preparo da polpa e modelo experimental

Ao serem recebidas no laboratório, as frutas foram selecionadas de acordo com o grau de sanidade visual (presença de podridão), imersas em solução com água clorada 4ppm, preparada a partir de solução de hipoclorito 10% (de acordo com a rotina das indústrias produtoras de polpas da região) por 15 minutos.

A polpa foi obtida pela trituração da fruta em liquidificador, não sendo separadas as sementes. Após a polpa foi embalada em sacos de polietileno de alta densidade (0,45 micra), em porções com as quantidades necessárias (em torno de 500g) para as amostragens e então armazenados nas temperaturas de -10, -18, -80°C, segundo a tabela 2. O experimento constou de 36 amostras de polpas de amora-preta decorrentes do delineamento inteiramente casualizado entre 12 tratamentos (três temperaturas de armazenamento e 4 amostragens) e com três repetições, perfazendo 396 determinações.

Tabela 2 - Modelo experimental.

Tratamentos	Variáveis independentes		Variáveis dependentes
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) armazenamento	Tempo (meses)	
T1	-10 $^{\circ}\text{C}$	Zero	Fenóis Totais
		2	Fenóis Individuais
		4	Antocianinas Totais
		6	Carotenóides Totais
T2	-18 $^{\circ}\text{C}$	Zero	Carotenóides Individuais
		2	Capacidade Antioxidante
T3	-80 $^{\circ}\text{C}$	4	Tocoferóis Individuais
		6	Ácido Ascórbico
T3	-80 $^{\circ}\text{C}$	Zero	Sólidos Solúveis
		2	pH
		4	Acidez Titulável
		6	

•T₁: -10°C±2°C, estocadas em freezer convencional no laboratório de cromatografia/DCTA/UFPel;

•T₂: -18°C±2°C, estocadas em freezer industrial na CESA/Pelotas;

•T₃: -80°C±2°C, estocadas em ultrafreezer no laboratório de cromatografia/DCTA/UFPel.

3.3 Determinações analíticas

Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicata, com a polpa de amora-preta recém preparada e nas polpas congeladas nas diferentes temperaturas e tempos de armazenamento.

3.3.1 Determinações físico-químicas gerais

- **pH**: Método potenciométrico, com amostra à temperatura ambiente;

- **Acidez titulável**: Método volumétrico, pela titulação com NaOH 0,1N, expressa em % de ácido málico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

-**Sólidos solúveis**: Realizando a leitura em refratômetro de Abbé, à 20°C, expressos em °Brix.

3.3.2 Quantificação de fenóis totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método descrito por Badiale-Furlong et al. (2003), com poucas modificações. Pesou-se 35 gramas de amostra previamente triturada e diluiu-se em 25mL de metanol. A amostra foi homogeneizada a cada 5 minutos durante 1 hora a temperatura ambiente. Filtrou-se com algodão, transferindo o homogeneizado para balão volumétrico de 50mL, completando-se o volume com metanol. Para clarificar o extrato aquoso, adicionou-se 5mL de solução de hidróxido de bário 0,1M e 5mL de solução de sulfato de zinco a 5%, ficando em repouso por 20 minutos para então realizar uma centrifugação.

Para realizar a quantificação dos fenóis totais, utilizou-se 2mL do extrato clarificado, ao qual foi adicionado 4,5 mL de solução de carbonato de sódio a 2% em NaOH 0,1M. Deixou-se 10 minutos em banho maria à 37°C e então foi adicionado 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:2, v/v) em água ultra pura. Após realizou-se a leitura em espectrofotômetro (modelo Ultrospec 2000) a 765nm, usando metanol para leitura do branco.

Procedeu-se a elaboração da curva padrão de ácido gálico para a quantificação dos fenóis. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico.100g⁻¹ fruta fresca.

3.3.3 Identificação e quantificação de compostos fenólicos individuais

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

O cromatógrafo consistiu no sistema HPLC-Shimadzu, com injetor automático, detector UV-visível a 280nm, coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (5µm, 4,6mm x 150mm) com fase estacionária octadecil e uma coluna de guarda CLC-GODS (4) com fase estacionária de superfície octadecil, ambas localizadas em forno a 25°C. A fase móvel consistiu no gradiente de eluição utilizando solução aquosa de ácido acético (99:1, v/v) e metanol (tab. 3), com fluxo de 0,8mL/ min, com um tempo total de corrida de 45 minutos, segundo metodologia descrita por Zambiasi (1997).

Tabela 3 - Programa do gradiente de eluição utilizado na separação de compostos fenólicos em amora-preta cv. Tupy

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

Solvente A: solução aquosa de ácido acético (99:1, v/v) Solvente B: metanol

Os compostos fenólicos individuais foram identificados e quantificados com base da curva de calibração de padrões, cujos padrões foram dissolvidos em metanol, incluindo o ácido p-coumárico, ácido cafeico, quercetina, ácido ferúlico, epicatequina, ácido p-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido elágico, catequina, miricetina e kaempferol. Os valores dos pontos de calibração formam estipulados com base em estudos prévios de quantificação de compostos fenólicos individuais em pequenas frutas (SHAHZAD et al., 1996).

Os resultados foram expressos em mg do composto fenolico.100g⁻¹ fruta fresca.

3.3.4 Quantificação de antocianinas totais

A determinação de antocianinas totais foi realizada segundo o método descrito por Lees e Francis (1972), com poucas adaptações. No estudo, pesou-se

um grama de amostra, deixou-se em repouso por 1 hora em um béquer com 25mL de etanol acidificado com ácido clorídrico até pH 1,0, homogeneizando-se a amostra a cada 5min. Após, o resíduo foi filtrado e completou-se o volume com etanol em balão volumétrico de 50mL. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (modelo Ultrospec 2000) a 520nm, usando etanol para calibrar o equipamento.

O cálculo da concentração total de antocianinas foi baseado na Lei de Beer (eq. 1), e os resultados foram expressos em mg de cianidina 3-glicosídeo por 100 gramas de fruta fresca.

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l \text{ (eq.1)}$$

Onde: A= absorvância

ϵ = Coeficiente de absorção molar

C= concentração mol/L

l = caminho óptico em cm

3.3.5 Identificação e quantificação do ácido L-ascórbico

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

A análise de cromatografia líquida de alta eficiência consistiu no sistema HPLC-Shimadzu (idem ao descrito na análise de compostos fenólicos), utilizando o detector UV-visível a 254 nm. A separação foi desenvolvida utilizando um sistema de gradiente com as fases móveis contendo água ultra pura:ácido acético (99,9:0,1, v/v) e metanol (tab. 4), com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, seguindo a metodologia adaptada de Vinci, Rot e Mele (1995) e de Ayhan, Yeom e Zhang (2001).

Tabela 4 - Programa do gradiente de eluição utilizado na separação do ácido L-ascórbico em amora-preta cv. Tupy.

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	100	0

5	98	2
7	98	2
10	100	0

Solvente A: solução de água ultra pura:ácido acético (99,9:0,1, v/v) Solvente B: metanol

Para a identificação e quantificação de vitamina C utilizou-se a curva de padrão externo preparada com o ácidos L-ascórbico. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico.100g⁻¹ de fruta fresca.

3.3.6 Identificação e quantificação de tocoferóis

Para a extração de tocoferóis, foi utilizada a metodologia para extração de carotenóides de Rodriguez-Amaya (1999), com algumas modificações, onde foram adicionadas aproximadamente três gramas de celite a cerca de vinte gramas de amostra (triturada), homogeneizando-a. A seguir foram adicionados 20mL de acetona gelada e procedeu-se a agitação por 10 minutos.

Após a amostra foi filtrada sob vácuo e o resíduo foi lavado com acetona até que o mesmo ficasse incolor. Após o filtrado foi transferido para um funil de separação e acrescentou-se 30mL de éter de petróleo e 100mL de água destilada até completar o volume final do balão (procedimento repetido 4 vezes). A fase aquosa (parte inferior) foi descartada e continuou-se lavando a fase superior com água destilada para a remoção total da acetona. Após aferiu-se o balão com éter de petróleo. O extrato foi transferido para tubos eppendorf, centrifugou-se nas condições de 9.000 rpm por 6 minutos, utilizando-se o sobrenadante para a avaliação dos tocoferóis por cromatografia líquida, utilizando-se cerca de 20µL.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência consistiu no sistema HPLC-Shimadzu (idem ao descrito para a análise de compostos fenólicos), equipado com detector de fluorescência, utilizando o comprimento de onda de 290nm para excitação e de 330nm para a emissão.

A separação foi efetuada utilizando um sistema de eluição por gradiente, utilizando como fases móveis o metanol, acetonitrila e isopropanol (tab. 5), seguindo a metodologia adaptada de Zambiasi (1997).

Tabela 5 - Programa do gradiente de eluição utilizado na separação de tocoferóis em amora-preta cv. tupy

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Solvente C (%)
0	40	50	10
10	65	30	5
12	40	50	10
15	40	50	10

Solvente A: metanol, Solvente B: acetonitrila, Solvente C: isopropanol

Para a identificação e quantificação de α -, δ - e γ -tocoferol utilizou-se uma curva de padrão, preparada com os padrões cromatográficos correspondentes. A quantificação de β -tocoferol foi realizada baseado na curva de calibração do δ -tocoferol, porque estes dois compostos não são separados no processo cromatográfico, e portanto, são quantificados conjuntamente. O conteúdo total de tocoferóis na amora, expresso em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de fruta fresca, foi determinado pela soma dos tocoferóis individuais.

3.3.7 Quantificação de carotenóides totais

A determinação de carotenóides totais foi realizada segundo o método descrito por Rodriguez-Amaya (1999), com algumas adaptações. Foi pesado 5g de amostra e 2g de celite. Adicionou-se 20mL de acetona gelada, agitando-se o conteúdo por 10 minutos. O material foi filtrado em funil de buchner com papel filtro, lavando a amostra com acetona até que o extrato ficasse incolor. O filtrado foi transferido para um funil de separação, onde acrescentou-se 30mL de éter de petróleo e em torno de 100mL de água destilada. Descartou-se a fase inferior e repetiu-se o procedimento por 4 vezes para ocorrer a remoção total da acetona. Transferiu-se o extrato superior para um balão volumétrico de 50mL, completando-se o volume com éter de petróleo. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (modelo Ultrospec 2000) a 450nm, usando éter de petróleo como branco.

O conteúdo de carotenóides foi determinado pela equação 2.

$$C = \text{ABS} \times 50 \text{ mL} \times 10^6 / 2.500 \times 100 \times \text{g amostra} \quad (\text{eq.2})$$

Onde, C= concentração da amostra e ABS= absorvância.

Os resultados foram expressos em mg de β -caroteno.100g⁻¹ fruta fresca.

3.3.8 Identificação e quantificação de carotenóides individuais

O processo de extração dos carotenóides foi realizado utilizando a mesma metodologia de extração de amostra para a determinação de carotenóides totais. Após a etapa de extração foi realizada a saponificação da amostra, adicionando 25mL de solução de KOH 1,5N em etanol em 25mL de amostra, deixando em repouso na ausência de luz por 18 h. Após a separação das fases, o extrato foi concentrado em rotaevaporador à 35 °C e dissolvido na fase móvel inicial (metanol: acetonitrila, 30:70 v/v). O extrato diluído foi transferido para tubos de eppendorf e centrifugado nas condições de 9000 rpm por 6 minutos. O sobrenadante (25 μ L) foi injetado no cromatógrafo líquido de alta eficiência.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência consistiu no sistema HPLC-Shimadzu (idem ao descrito para a análise de compostos fenólicos), equipado com detector UV, utilizando o comprimento de onda de 450nm.

A separação foi efetuada utilizando um sistema de eluição por gradiente de metanol, acetonitrila e acetato de etila (tab. 6), com um fluxo de 1mL/min.

Tabela 6 - Programa do gradiente de eluição utilizado na separação de carotenóides individuais em amora-preta cv. Tupy

Tempo (minutos)	Solvente B (%)	Solvente C (%)	Solvente D (%)
0	30	70	0
10	10	80	10
35	-5	80	15
40	30	70	0

Solvente A: metanol, Solvente B: acetonitrila, Solvente C: acetato de etila

Para a identificação e quantificação de β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina e licopeno utilizou-se uma curva de padrão, preparada com os padrões cromatográficos correspondentes. O conteúdo total de carotenóides individuais na amora-preta foi expressos em mg.100g⁻¹ de fruta fresca, e foram determinados pela soma dos carotenóides individuais.

3.3.9 Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada através da capacidade dos compostos presentes nas amostras em seqüestrar o radical estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), segundo método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berser (1995). Para a extração dos compostos com atividade antioxidante, pesou-se 5g da amostra em um frasco de Falcon de 50mL, e diluiu-se com 20 mL de metanol. A solução foi homogeneizada com auxílio de um Ultra-Turrax até consistência uniforme. Após armazenou-se por 24 horas em temperaturas de 3 a 4°C, seguido de centrifugação por 15 minutos.

A determinação foi realizada em tubos revestidos com papel alumínio, contendo 10µL do extrato da fruta, 90µL de metanol e 3,9mL de solução-uso de DPPH, com a finalidade de completar o volume final de 4,0mL.

Deixou-se a mistura no escuro por 30 minutos e após foi realizada a leitura a 517 nm em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 UV/Visível (Pharmacia Biotech). Após 24 horas realizou-se novamente a leitura.

A atividade seqüestrante de radicais livres foi determinada no estabelecimento de uma curva padrão de Trolox, obtendo-se uma equação da reta expressa por $y=0,5085x$. Os resultados foram expressos por capacidade antioxidante equivalente a Trolox relativa ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$).

3.4 Análise Estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA), e pelo teste de Tukey, ambos ao nível de 5% de significância, utilizando-se o Programa Statistic 7.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinações físico-químicas gerais

O teor de sólidos solúveis (11,2 °Brix) e valor de pH (3,40) da polpa logo após ter sido processada (tab. 7), apresenta-se superior aos descritos na literatura para fruta da mesma cultivar. Chim (2008) descreve valores de sólidos solúveis de

8,5 °Brix e pH 3,26, em amora-preta da safra 2006/2007; e Mota (2006) relata valores de sólidos solúveis de 7 °Brix e pH de 3,23, em amora-preta oriundas da safra 2003/2004.

Os valores encontrados neste estudo foram superiores possivelmente porque as frutas foram colhidas com maior grau de maturação em relação a dos outros autores citados. O clima tem influencia direta na composição dos açúcares das frutas. De acordo com estudos realizados na Embrapa, os melhores padrões de qualidade de frutas (concentração de açúcar e coloração adequada), são encontrados em áreas de temperaturas de verão, em particular no período de pré-colheita, relativamente altas, sem serem excessivas, combinadas com temperaturas amenas à noite. As frutas utilizadas neste trabalho, assim como no estudo realizado por Chim (2008), são provenientes do mesmo local e da mesma cultivar, porém de colheitas de anos diferentes. Com isto, pode-se inferir que o clima pode ter afetado diretamente sobre a concentração de açúcares e pH.

As maiores quedas no teor de sólidos solúveis foram observadas no sexto mês (t_3) de armazenamento nas três temperaturas estudadas (-10°C, -18°C e -80°C). De acordo com Andrade (2008), a queda do teor de sólidos pode estar associada à proliferação de microrganismos, principalmente leveduras e bolores, os quais consomem os açúcares disponíveis através do processo de fermentação, diminuindo as concentrações de sólidos solúveis. Apesar de não ter sido realizado neste estudo uma avaliação microbiológica, esta hipótese não pode ser descartada, no entanto, processos degradativos também podem provocar a redução no conteúdo de açúcares.

Durante o período de armazenamento observa-se que há diferença significativa nos valores de pH em todas as temperaturas e tempos avaliados, demonstrando que nem mesmo a uma temperatura de congelamento extremamente baixa (-80°C) foi suficiente para manter o pH inalterado. As quedas de pH foram observadas já a partir do segundo mês em todas temperaturas avaliadas (-10 °C, -18 °C e -80°C), podendo ser devido a proliferação de microrganismos que colaboraram para a ocorrência do processo fermentativo e a produção de ácidos orgânicos, levando ao aumento da acidez e queda do pH no meio. De acordo com Chaves (1993), vários fatores tornam importante a determinação do pH de um alimento, tais como: influência na palatabilidade, desenvolvimento de microrganismos, escolha da temperatura de esterilização, escolha do tipo de material de limpeza e

desinfecção, escolha do equipamento com o qual se vai trabalhar na indústria, escolha de aditivos e vários outros. Com isso pode-se observar que este tratamento de sanitização com cloro a 4 ppm, combinado com as temperaturas não foi eficiente nem mesmo nos 2 primeiros meses de armazenamento nas três temperaturas estudadas (-10 °C, -18 °C e -80°C).

O teor de acidez natural é representado principalmente pela presença do ácido málico, que é o ácido orgânico majoritário em amora-preta (BARBOZA, 1999 e KAFKAS, 2006). A acidez encontrada na amora-preta (0,105%) apresentou-se inferior aos valores descritos por Chim (2008), o qual descreve valores de 0,95% em ácido málico. O teor de acidez na amora-preta apresentou a tendência de um pequeno acréscimo durante o período de armazenamento, em duas das três temperaturas avaliadas (-10°C e -18°C), que coincide com a queda no valor do pH. No entanto, mesmo havendo esta tendência de acréscimo no conteúdo de acidez, não observou-se diferença significativa durante o período de estocagem nos 2 primeiros meses de armazenamento nas três temperaturas estudadas. Porém, a partir dos 4 meses (t_2), na temperatura de -10°C e -18°C houveram diferenças significativas, permanecendo valores constantes de acidez apenas na temperatura de -80°C. O aumento da acidez é um indício do início de deterioração ou fermentação da amostra (ESTEVE et al., 2005), ou devido a processos de hidrólise ou oxidação, que modificam a concentração de íons hidrogênios e, conseqüentemente, a acidez dos alimentos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

De acordo com dados da Embrapa Uva e Vinho (2003), temperaturas de verão com condições térmicas muito quentes podem resultar na obtenção de uvas com maiores teores de açúcares e menor conteúdo em acidez. Este pode um dos fatores responsáveis pelas diferenças encontradas neste estudo e no estudo descrito por Chim (2008), já que as frutas são provenientes da mesma região e cultivar, porém de safras diferentes.

Tabela 7 - Sólidos solúveis, acidez titulável e pH em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.

Temperatura /tempo	Sólidos solúveis (°Brix)	Acidez titulável (% em ácido málico)	pH
0	11,2±0,00 ^{Aa}	0,105±0,003 ^{Aa}	3,40±0,01 ^{Aa}

T ₁	t ₁	11,0±0,00 ^{Aa}	0,111±0,006 ^{Aa}	3,09±0,02 ^{Bb}
	t ₂	10,8±0,28 ^{Aa}	0,114±0,006 ^{Ab}	2,80±0,07 ^{Cb}
	t ₃	10,6±0,00 ^{Bb}	0,119±0,006 ^{Ab}	2,68±0,14 ^{Cb}
T ₂	t ₁	11,3±0,50 ^{Aa}	0,109±0,012 ^{Aa}	3,09±0,01 ^{Bb}
	t ₂	10,7±0,11 ^{Ab}	0,119±0,008 ^{Ab}	2,70±0,10 ^{Cb}
	t ₃	10,7±0,00 ^{Ab}	0,119±0,008 ^{Ab}	2,71±0,14 ^{Cb}
T ₃	t ₁	11,3±0,50 ^{Aa}	0,104±0,001 ^{Aa}	3,16±0,01 ^{Bc}
	t ₂	10,4±0,23 ^{Ca}	0,103±0,008 ^{Aa}	2,90±0,02 ^{Cb}
	t ₃	10,6±0,10 ^{Cb}	0,104±0,016 ^{Aa}	2,90±0,01 ^{Cc}

*Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão

**Letras maiúsculas indicam a diferença dentro da mesma temperatura ao longo do armazenamento (zero: logo após o processamento; t₁: 2 meses de armazenamento; t₂: 4 meses de armazenamento; t₃: 6 meses de armazenamento), ao nível de 5 % de significância

** Letras minúsculas indicam a diferença das diferentes temperaturas (T₁: -10°C; T₂: -18° e T₃: -80°C) ao longo do armazenamento.

4.2 Conteúdo total de compostos fenólicos e antociânicos

Muitos dos compostos fenólicos presentes em frutas e hortaliças são substâncias bioativas, cujas principais classes são representadas pelos flavonoides, ácidos fenólicos e pelos polifenóis (KING; YOUNG, 1999; GARCIA-ALONSO et al., 2004). A quantificação de compostos fenólicos totais é uma estimativa do conteúdo de todos os compostos pertencentes às classes de compostos fenólicos em uma amostra.

Quando comparado com dados reportados por Chim (2008) (569,89mg ác. gálico.100g⁻¹fruta), os resultados encontrados neste estudo para a amora-preta são bem superiores (1938,70mg ác. gálico/100g⁻¹fruta) (tab. 8). Esta diferença no conteúdo de fenóis pode estar relacionado a diferença de metodologias empregadas na extração da amostra. Chim (2008) utilizou somente o suco obtido da prensagem da polpa da fruta, e neste estudo utilizou-se uma extração dos compostos da polpa com o uso de metanol.

O conteúdo de compostos fenólicos totais na amora-preta avaliada neste estudo foi superior quando comparado com o mirtilo cv. Bluegem (952mg ác.

gálico.100g⁻¹fruta) (MOYER et al., 2002), porém foi inferior quando comparado com o conteúdo na acerola (2372mg catequina.100g⁻¹fruta) (LIMA et al., 2005). O autor citado utilizou a catequina para expressar o resultado sendo este o fenol majoritário na acerola.

O conteúdo de antocianinas totais encontrado na polpa de amora-preta (tempo zero) foi 140,73mg cianidina-3-glicosídeo.100g⁻¹, que praticamente coincide com os valores descritos Chim (2008), a qual relata 137,59mg cianidina-3-glicosídeo.100g⁻¹ de amora-preta da cultivar Tupy. Este conteúdo apresentou-se ligeiramente inferior ao descrito por Mota (2006) (194,59mg cianidina-3-glicosídeo.100g⁻¹) e por Silva, Lopes e Valente-Mesquita (2006) (158,21mg cianidina-3-glicosídeo.100g⁻¹). As diferenças observadas quanto ao conteúdo de antocianinas totais pode estar relacionada com as variações genéticas, condições ambientais durante a colheita e também devido à ação enzimática na pós-colheita, principalmente devido a processos oxidativos das polifenoloxidasas, cujo principal substrato é a cianidina-3-glicosídeo (BEATTIE; CROZIER; DUTHIE, 2005; LIMA; GUERRA, 2003).

Durante o armazenamento sob congelamento observa-se uma redução muito pequena no conteúdo de compostos fenólicos até o quarto mês de armazenamento (t₂), sem haver diferença significativa ao nível de 5% de significância. Observa-se que em todas as temperaturas de armazenamento somente ocorreram perdas significativas de compostos fenólicos ao final do período de estocagem (t₃). A menor redução no conteúdo destes compostos foi encontrada nas polpas armazenadas à -80°C, porém mesmo nesta temperatura extremamente baixa ocorreu uma perda em torno de 8,2% destes compostos durante o armazenamento de 6 meses, enquanto que nas temperaturas de -10°C e -18°C as perdas foram de 22% e 23% no mesmo período de armazenamento, demonstrando que estas temperaturas são suficientes para a conservação dos compostos fenólicos totais apenas durante 4 meses de armazenamento.

Ao longo do armazenamento, observa-se que os compostos antociânicos permaneceram constantes até os 2 primeiros meses de armazenamento nas três temperaturas (-10°C, -18°C e -80°C). Porém, mesmo sem apresentar diferenças significativas, pode-se observar perdas de 33,5%, 30,0% e 27,0% nas temperaturas de -10°C, -18°C e -80°C, respectivamente.

No armazenamento durante 4 meses, a temperatura de -10°C e -18°C não foram suficientes para evitar as perdas, com isso, observa-se que para manter os compostos antociânicos inalterados num período de 4 meses de armazenamento é necessário uma temperatura abaixo de -18°C , como demonstrado neste estudo com amora-preta. As perdas observadas na temperatura de -10°C aos 4 e 6 meses de armazenamento foram de 43% de redução de compostos antociânicos na polpa de amora-preta. ARAÚJO et al. (2007), estudando a estabilidade de clones de polpa de aceroleira, verificou uma redução de 36,27% no conteúdo antociânico em polpa do clone Apodi armazenada em uma temperatura de -18°C . Estas perdas ratificam a influência da temperatura na estabilidade destes pigmentos.

Durante o congelamento, as reações metabólicas são reduzidas, porém não são totalmente inibidas (CHEFTEL; CHEFTEL; BESANÇON *apud* CHEFTEL; CHEFTEL; BESANÇON, 1983). As variações nos teores de antocianinas e flavonóides totais observadas durante o período de armazenamento podem ser justificadas pela interconversão das quatro formas estruturais de antocianinas (base quinoidal, cátion flavilium, pseudobase ou carbinol e chalcona) que, em solução aquosa ácida, se encontram em equilíbrio (MAZZA; BROUILLARD, 1987). Por outro lado, a degradação desses pigmentos pode também ser favorecida por ação enzimática, tendo em vista que a polpa produzida não foi submetida a algum tratamento térmico de inativação.

A relação fenóis/antocianinas variou de 13,7 à 31,3, não seguindo uma tendência, porém pode-se observar que a essa relação aumentou logo após o processamento comparando com o tempo zero.

Tabela 8 - Compostos fenólicos e antociânicos em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.

Temperatura /tempo	Fenóis Totais (mg ác. gálico 100g^{-1} fruta)	Antocianinas totais (mg cianidina-3-glicosídeo 100g^{-1} fruta)	Relação Fenóis/Antocianinas
0	1938,70 \pm 44,32 ^{Aa}	140,73 \pm 10,48 ^{Aa}	13,7
T ₁	t ₁	1938,70 \pm 201,11 ^{Aa}	93,57 \pm 11,62 ^{Aa}
	t ₂	1920,89 \pm 122,67 ^{Aa}	61,24 \pm 10,30 ^{Bb}
	t ₃	1490,05 \pm 32,99 ^{Bb}	61,28 \pm 2,88 ^{Bb}

T ₂	t ₁	1930,35±22,90 ^{Aa}	97,61±1,10 ^{Aa}	19,7
	t ₂	1936,54±63,89 ^{Aa}	70,55±4,50 ^{Bb}	27,4
	t ₃	1505,02±49,62 ^{Bb}	70,32±8,37 ^{Bb}	21,4
T ₃	t ₁	1938,54±67,36 ^{Aa}	102,16±14,56 ^{Aa}	18,9
	t ₂	1921,62±15,80 ^{Aa}	95,25±4,43 ^{Aa}	20,1
	t ₃	1780,02±57,38 ^{Ab}	97,47±16,45 ^{Aa}	18,2

*Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão

**Letras maiúsculas indicam a diferença dentro da mesma temperatura ao longo do armazenamento (zero: logo após o processamento; t₁: 2 meses de armazenamento; t₂: 4 meses de armazenamento; t₃: 6 meses de armazenamento), ao nível de 5 % de significância

** Letras minúsculas indicam a diferença das diferentes temperaturas (T₁:-10°C; T₂:-18° e T₃: -80°C) ao longo do armazenamento.

4.3 Conteúdo de compostos fenólicos individuais

A quercetina, a epicatequina e os ácidos caféico, ferúlico, hidróxibenzóico e gálico, foram os compostos fenólicos separados e identificados por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando como meio de separação uma coluna de fase reversa (fase estacionária apolar), onde ambos apresentaram alta reprodutibilidade na análise (Fig. 9).

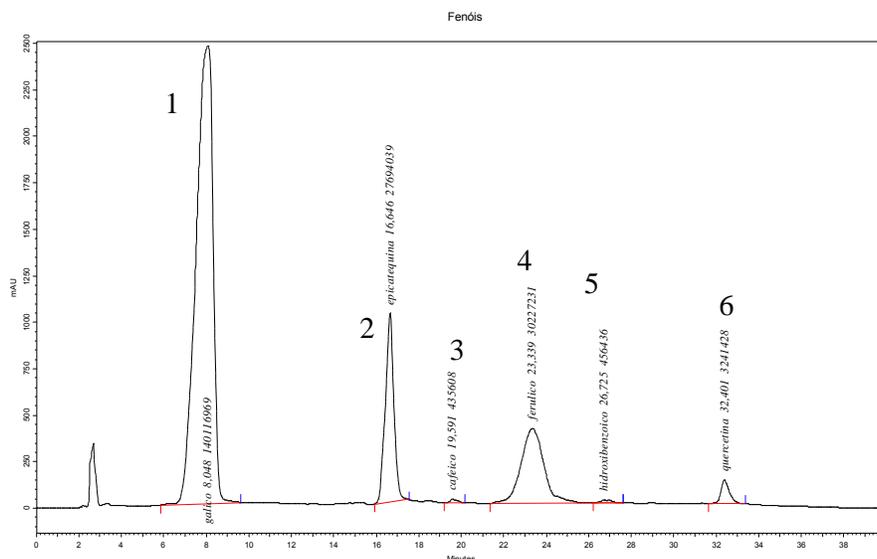


Figura 9 - Cromatograma de compostos fenólicos em amora-preta cv. Tupy. Clae com coluna em fase reversa e detector UV (280 nm). 1: ácido gálico, 2: epicatequina, 3: ácido caféico, 4: ácido ferúlico, 5: ácido hidroxibenzóico, 6: quercetina . Fase móvel: gradiente de ácido acético em água (1:99 v/v) e metanol com fluxo de 0,9mL/min

O ácido gálico foi o ácido fenólico predominante (tab. 9), dentre os compostos fenólicos analisados. Estes dados estão de acordo com os resultados reportados por Chim (2007), que também descreve o ácido gálico como sendo o ácido fenólico predominante em amora - preta cv. Tupy. Estes resultados confirmam dados da literatura que reportam o ácido gálico como sendo o ácido fenólico de maior expressão dentre os compostos fenólicos identificados em amora-preta (SINGLETON; ROSSI, 1996).

De acordo com Siriwoharn e Wrolstad (2004), foram identificados na amora-preta o ácido elágico, ácido gálico, quercetina e kampferol, diferenciando-se deste estudo, onde não foram identificados o ácido elágico e o kampferol. No entanto, estas diferenças na constituição dos compostos fenólicos pode ser pelas diferenças de espécie e cultivar, já que estes autores utilizaram amora Marion (*Rubus sp. hyb*) e Evergreen (*Rubus laciniatus*), e a amora-preta avaliada neste estudo foi da espécie *Rubus fruticosus*.

A metodologia de separação e quantificação dos compostos fenólicos foi estabelecida para o presente trabalho, com base em testes de extração e condições cromatográficas preliminares realizados por Chim (2008), utilizando como base, os métodos descritos nos trabalhos de Häkkinen et al. (1998) e Zambiasi (1997), passando por hidrólise ácida. De acordo com Chim (2008), uma pequena adaptação da metodologia apresentou melhores resultados e reprodutibilidade. Neste estudo, eliminou-se a adição da água no processo de extração, utilizando-se apenas metanol acidificado com ácido clorídrico 6M. Assim, obteve-se uma redução no tempo de evaporação no rotaevaporador, ocasionando menor variabilidade no conteúdo de compostos fenólicos.

Os dados de quantificação de compostos fenólicos individuais em cultivares de amora-preta nacionais são ainda pouco explorados. Sellappan, Akoh e Krewer (2002), analisando cultivares de amora-preta Choctaw e Kiowa, reportaram os ácidos gálico e o ácido caféico como os ácidos majoritários, com 6,42 a 4,12mg.100g⁻¹ e 1,38 a 3,64mg.100g⁻¹, respectivamente, porém, as amostras não passaram por uma hidrólise durante o processo de extração, sendo estes resultados bem inferiores aos encontrados no presente trabalho (tab. 9).

Pela comparação do somatório dos compostos fenólicos individuais (tab. 9) com o conteúdo dos compostos fenólicos totais (tab.8), pode-se observar uma

grande diferença, sendo que a soma do conteúdo dos ácidos fenólicos e dos flavanols individuais quantificados via cromatografia perfazem cerca de 30% do total de compostos fenólicos presentes na amora-preta cv. Tupy. O remanescente do total de compostos fenólicos é devido à presença de polímeros fenólicos e de outros componentes presentes em suas sub-classes, os quais também são quantificados na determinação do conteúdo total de fenóis da amostra, mas não são quantificados como ácidos fenólicos e flavanols (CHIM, 2008).

Com relação ao armazenamento das polpas nas diferentes temperaturas e tempos, pode-se observar que houve uma degradação já nos 2 primeiros meses de armazenamento nas temperaturas de -10°C e -18°C em relação ao ácido hidroxibenzóico, ácido gálico, ácido ferúlico e epicatequina. Portanto, estas temperaturas não são suficientes para evitar a degradação destes compostos fenólicos por 2 meses de armazenamento.

A estrutura química dos fenóis é formada pelo anel benzênico com grupos hidroxilas associadas diretamente à estrutura cíclica. Observa-se que o ácido gálico apresentou uma das maiores degradações dentre os compostos fenólicos individuais, podendo ser devido sua estrutura altamente hidroxilada, causando assim uma maior disponibilidade para reações de oxidação-redução.

As temperaturas (-10 e -18°C) foram suficientes para evitar a degradação da quercetina e do ácido caféico durante os mesmos 2 meses.

Pelo somatório dos compostos fenólicos, demonstrados na última coluna da tab. 9, pode-se observar que nenhuma temperatura foi eficiente para evitar a degradação de compostos fenólicos, nem mesmo a temperatura de -80°C .

Os pigmentos predominantes na amora-preta são as antocianinas, porém neste estudo, de acordo com o observado na tabela 9, a maioria dos compostos fenólicos encontrados são ácidos fenólicos que não fazem parte dos compostos flavonóides onde destacam-se as antocianinas, por esse motivo a relação fenóis/antocianinas foi baixa (tab.8).

Tabela 9 - Compostos fenólicos individuais presentes em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.

Temperatura /tempo	Compostos fenólicos ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$)						Total
	Ácido Hidroxi-	Ácido Gálico	Querce-Tina	Ácido Caféico	Ácido Ferúlico	Epicatequina	

Benzóico								
	0	0,0144 ^{Aa}	350,490 ^{Aa}	20,230 ^{Aa}	15,400 ^{Aa}	35,700 ^{Aa}	120,179 ^{Aa}	542,013 ^{Aa}
T ₁	t ₁	0,0125 ^{Bb}	145,850 ^{Bb}	20,220 ^{Aa}	15,340 ^{Aa}	22,090 ^{Bb}	94,290 ^{Bb}	297,802 ^{Bb}
	t ₂	0,0123 ^{Bb}	113,270 ^{Cb}	14,450 ^{Bb}	3,900 ^{Bb}	17,850 ^{Bb}	52,450 ^{Cb}	201,932 ^{Cb}
	t ₃	0,0111 ^{Cb}	110,490 ^{Cb}	15,030 ^{Bb}	1,970 ^{Cb}	1,970 ^{Cb}	44,190 ^{Cb}	173,661 ^{Db}
T ₂	t ₁	0,0125 ^{Bb}	148,960 ^{Bb}	19,930 ^{Aa}	15,730 ^{Aa}	23,720 ^{Bb}	95,760 ^{Bb}	304,112 ^{Bb}
	t ₂	0,0136 ^{Cc}	127,790 ^{Cc}	14,940 ^{Bb}	4,840 ^{Bb}	21,180 ^{Bc}	53,980 ^{Cb}	222,743 ^{Cc}
	t ₃	0,0125 ^{Bc}	113,130 ^{Db}	15,030 ^{Bb}	1,970 ^{Cb}	2,980 ^{Cc}	44,930 ^{Cb}	178,052 ^{Db}
T ₃	t ₁	0,0145 ^{Aa}	151,870 ^{Bc}	20,240 ^{Aa}	15,30 ^{Aa}	27,480 ^{Bc}	120,17 ^{Aa}	335,074 ^{Bc}
	t ₂	0,0149 ^{Aa}	143,770 ^{Bd}	19,920 ^{Ac}	8,170 ^{Bc}	22,930 ^{Cc}	76,820 ^{Bc}	271,624 ^{Cd}
	t ₃	0,0154 ^{Ad}	120,020 ^{Cc}	16,940 ^{Bc}	2,070 ^{Cc}	3,200 ^{Dc}	65,500 ^{Bc}	207,884 ^{Dc}

*Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão

**Letras maiúsculas indicam a diferença dentro da mesma temperatura ao longo do armazenamento (zero: logo após o processamento; t₁: 2 meses de armazenamento; t₂: 4 meses de armazenamento; t₃: 6 meses de armazenamento), ao nível de 5 % de significância

***Letras minúsculas indicam a diferença das diferentes temperaturas (T₁: -10°C; T₂: -18° e T₃: -80°C) ao longo do armazenamento.

4.4 Conteúdo de tocoferóis individuais

O delta (δ -) e o alfa (α -) tocoferóis apresentaram separação bem definida em coluna de fase reversa (fase estacionária apolar), porém, utilizando-se destas condições cromatográficas, o beta (β -) e o gama (γ -) tocoferol não apresentaram separação, sendo então quantificados conjuntamente (Fig. 10).

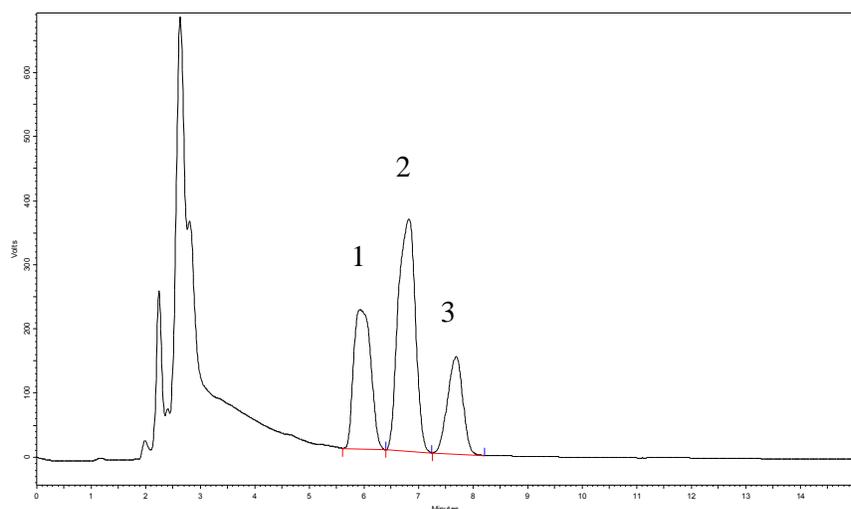


Figura 10 - Cromatograma de tocoferóis em amora-preta cv. Tupy. Clae com coluna em fase reversa e detector de fluorescência, 290 nm de excitação e 330 nm de emissão. 1: delta-tocoferol, 2: gama e beta-tocoferol, 3: alfa- tocoferol. Gradiente com acetonitrila:metanol:isopropanol, 50:40:10 v/v/v, com fluxo de 1,0mL/min

A vitamina E é encontrada principalmente em produtos que apresentam alto teor em gordura, como amêndoas, óleos vegetais e algumas frutas e vegetais (LINS, 2006). A amora-preta apresentou uma quantidade muito pequena de tocoferóis (tab. 10), o que pode ser explicado pela baixa quantidade de gordura presente nesta fruta.

O teor de tocoferóis totais na polpa de amora-preta recém processada foi de 0,870mg tocoferol.100g⁻¹fruta fresca, o qual reduziu sensivelmente durante o período de armazenamento. A única temperatura que foi eficiente para não ocorrer as perdas nos primeiros 2 meses foi a -80°C, demonstrando que as temperaturas de -10 e -18°C não são eficientes para preservação de tocoferóis na amora-preta. Mesmo a uma temperatura de -80°C, os tocoferóis foram degradados a partir dos 2 meses de armazenamento.

Chun et al. (2006) encontraram para a amora-preta 3,74mg.100g⁻¹ de tocoferóis totais, resultados bem superiores ao encontrado neste estudo (0,870mg.100g⁻¹), porém, ressalta-se que estes autores quantificaram separadamente o δ, β, γ e α-tocoferol, e no presente estudo quantificou-se conjuntamente o β+γ tocoferóis, que pode ser, pelo menos parcialmente, um dos motivos desta diferença, além das diferenças entre cultivares, espécies, clima, entre outros.

Os dados de quantificação de tocoferóis em amora-preta são escassos, por isso os resultados foram comparados com estudos de outras frutas. As frutas que apresentaram resultados que mais se assemelharam com o deste estudo foram o figo (0,76mg.100g⁻¹) e a nectarina (0,73mg.100g⁻¹), e dentre as pequenas frutas foi o mirtilo (1,05mg.100g⁻¹) (CHUN et al., 2006). Lee et al. (2000) realizaram um estudo com tomates e encontraram conteúdo de tocoferóis totais (0,89mg.100g⁻¹) muito próximos ao encontrado para a amora-preta avaliada neste estudo (0,870mg.100g⁻¹).

Tabela 10 - Tocoferóis totais em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.

Temperatura/ Tempo	Tocoferóis (mg.100g ⁻¹)			
	δ –Tocoferol	(β+γ)- Tocoferol	A-Tocoferol	Total (α+β+γ+δ)
Zero	0,497 ^{Aa}	0,248 ^{Aa}	0,124 ^{Aa}	0,870 ^{Aa}
t ₁	0,192 ^{Bb}	0,144 ^{Bb}	0,241 ^{Bb}	0,578 ^{Bb}

T ₁	t ₂	0,073 ^{Cb}	0,024 ^{Cb}	0,194 ^{Cb}	0,292 ^{Cb}
	t ₃	0,098 ^{Db}	0,024 ^{Cb}	0,024 ^{Db}	0,147 ^{Db}
	t ₁	0,269 ^{Bc}	0,220 ^{Bc}	0,147 ^{Bc}	0,637 ^{Bb}
T ₂	t ₂	0,174 ^{Cc}	0,074 ^{Cc}	0,049 ^{Cc}	0,297 ^{Cc}
	t ₃	0,074 ^{Dc}	0,049 ^{Dc}	0,024 ^{Db}	0,149 ^{Db}
	t ₁	0,445 ^{Ba}	0,198 ^{Bd}	0,198 ^{Bd}	0,842 ^{Ba}
T ₃	t ₂	0,209 ^{Cd}	0,186 ^{Ca}	0,232 ^{Cd}	0,627 ^{Cd}
	t ₃	0,203 ^{Dd}	0,181 ^{Dd}	0,113 ^{Da}	0,498 ^{Dc}

*Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão

**Letras maiúsculas indicam a diferença dentro da mesma temperatura ao longo do armazenamento (zero: logo após o processamento; t₁: 2 meses de armazenamento; t₂: 4 meses de armazenamento; t₃: 6 meses de armazenamento), ao nível de 5 % de significância

***Letras minúsculas indicam a diferença das diferentes temperaturas (T₁: -10°C; T₂: -18° e T₃: -80°C) ao longo do armazenamento.

4.5 Conteúdo de ácido ascórbico

A Fig. 11 representa o cromatograma típico para a determinação de ácido L-ascórbico para a polpa de amora-preta cv. Tupy, onde pode-se observar que ambos tiveram uma boa separação.

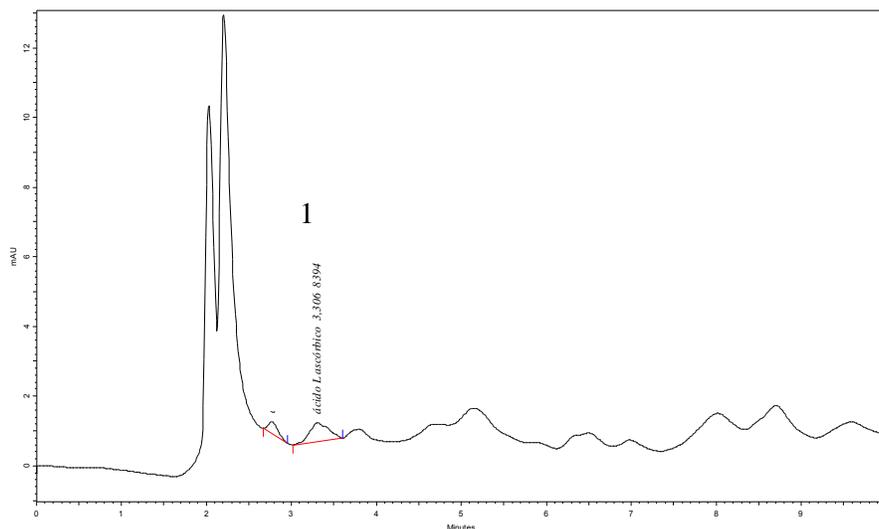


Figura 11 - Cromatograma da vitamina C em amora-preta cv. Tupy. Claee com coluna em fase reversa e detector UV (254 nm). 1: ácido-L-ascórbico.. Gradiente de solução água ultra pura:ácido acético (99,9:0,1 v/v) e metanol, com fluxo de 0,8mL/min.

De acordo com os dados (tab.11) observa-se que o conteúdo de ácido ascórbico presente na amora-preta é baixo quando comparado com outras frutas

estudados por Hernández, Lobo e Gonzáles (2006) e Araújo et al. (2007), como o mamão papaya ($86,0\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$), manga ($89,0\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) e acerola ($183\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$). Chim (2008) relata teores de $2,4\text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de ácido L-ascórbico na amora-preta cv. Tupy, resultado superior ao encontrado neste estudo ($0,9\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$), .

O teor inicial de ácido ascórbico na forma de ácido L-ascórbico na amora-preta foi de $0,9\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, não apresentando diferença ao nível de 5% de significância após 2 meses de armazenamento nas temperaturas de -10 e -18°C . O mesmo não foi observado a partir de 4 meses nessas temperaturas, e aos 6 meses observou-se degradação total dessa vitamina nessas temperaturas, confirmando que esta vitamina é altamente afetada pela ação da temperatura.

O ácido ascórbico foi totalmente degradado nas polpas após seis meses de armazenamento, com exceção da polpa armazenada na temperatura de -80°C onde observou-se perda em torno de 57%.

Estes dados suportam afirmações da literatura, que citam que embora a estabilidade da vitamina C aumente com a redução da temperatura e a maior perda ocorra durante o aquecimento dos alimentos, ocorrem perdas durante o congelamento ou armazenamento a baixas temperaturas (BOBBIO; BOBBIO, 1995).

Yamashita et al. (2003), estudando a estabilidade do ácido ascórbico em produtos de acerola, determinaram perdas de aproximadamente 3% em polpas de acerola armazenadas a temperatura de congelamento comercial (-12°C e -18°C) durante um período de 4 meses inferiores às encontradas por Araújo et al. (2004), as quais variaram de 2,77% a 17,88% em quatro diferentes clones de aceroleira, armazenadas por 12 meses a na temperatura de -18°C .

Tabela 11 - Ácido L-ascórbico e ácido L-dehidroascórbico em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.

Temperatura/ tempo	Ac.L-ascórbico
Zero	$0,9^{\text{Aa}}$
T_1 t_1	$0,9^{\text{Aa}}$
t_2	$0,1^{\text{Bb}}$
t_3	0^{C}
t_1	$0,9^{\text{Aa}}$
T_2 t_2	$0,1^{\text{Bb}}$

	t_3	0°C
	t_1	0,1 ^{Bb}
	T_3 t_2	0,1 ^{Bb}
	t_3	0,1 ^{Bc}

*Médias de três repetições \pm estimativa de desvio padrão

**Letras maiúsculas indicam a diferença dentro da mesma temperatura ao longo do armazenamento (zero: logo após o processamento in natura; t_1 : 2 meses de armazenamento; t_2 : 4 meses de armazenamento; t_3 : 6 meses de armazenamento), ao nível de 5 % de significância

***Letras minúsculas indicam a diferença das diferentes temperaturas (T_1 : -10°C ; T_2 : -18° e T_3 : -80°C)

4.6 Conteúdo de carotenóides totais

Os carotenos de modo geral apresentam-se de cor amarela. Na amora-preta, devido ao elevado conteúdo de antocianinas totais, esta coloração não é representativa como em outras frutas.

O conteúdo inicial de carotenóides totais na polpa de amora-preta foi de $0,877\text{mg } \beta\text{-caroteno} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de fruta fresca, valor superior ao da acerola ($0,53\text{mg de } \beta\text{-caroteno} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de fruta) que, assim como a amora-preta tem uma predominância de antocianinas (ARAÚJO, et al., 2007).

Estudos de Jacques et al. (2007) com amora-preta cv. Tupy (safra 2006/2007) reportam um conteúdo de carotenóides totais de $0,597\text{mg de } \beta\text{-caroteno} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de fruta. Este resultado é inferior aos dados expostos no estudo de Marinova e Ribarova (2006), os quais encontraram $0,44\text{mg de } \beta\text{-caroteno} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de fruta, representando cerca da metade do conteúdo de carotenóides totais encontrados neste estudo.

Foram observadas perdas de carotenóides logo nos primeiros 2 meses de armazenamento, em todas as temperaturas de congelamento (-10°C , -18°C e -80°C), sendo estas perdas em torno de 52%, 38% e 32% respectivamente. Mesmo com a temperatura de -80°C , ao final dos 6 meses de armazenamento as perdas ficaram em torno de 77%.

Lopes, Mattietto e Menezes (2005), relatam perdas de carotenóides totais em pitanga congelada de 15%, quando armazenadas por 60 dias na temperatura de -18°C . Neste estudo, as polpas de amora-preta armazenadas neste mesmo tempo (2 meses) e mesma temperatura (-18°C), as perdas foram de 38%.

Araújo et al. (2007) relatam perdas de 21,45% até 35,54% de carotenóides em polpa de acerola armazenada à -18°C durante doze meses. Com o estudo

destes autores, pode-se observar que os carotenóides presentes na acerola levaram 12 meses para se degradar enquanto que na amora-preta levaram apenas 2 meses, quando armazenadas na mesma temperatura. A maior preservação destes compostos no estudo realizado por estes autores foi devido a utilização do processo de congelamento rápido em congelador de placas, o que permite a formação de cristais de gelo de menor tamanho e, portanto, causa menor dano celular da fruta, reduzindo a exposição do pigmento aos fatores externos. O congelamento lento ocasiona, além do rompimento das membranas celulares, alteração na textura das frutas.

Thakur e Arya (1988) verificaram uma maior perda dos carotenóides totais em polpa de manga que não foram submetidas a um tratamento térmico (branqueamento) preliminar à estocagem em temperatura de -12°C . Assim, os autores relataram a necessidade da inativação das enzimas responsáveis pelo processo oxidativo antes de realizar o congelamento. Neste estudo, as polpas de amora-preta não passaram por um tratamento térmico para a inativação das enzimas antes do congelamento, e isto pode ter sido outro fator para a grande degradação dos carotenóides.

Tabela 12 - Carotenóides totais em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.

Temperatura /tempo	Carotenóides Totais mg de β -caroteno. 100g^{-1} de fruta
0	$0,877 \pm 0,66^{\text{Aa}}$
T ₁ t ₁	$0,419 \pm 0,06^{\text{Bb}}$
t ₂	$0,301 \pm 0,06^{\text{Cb}}$
t ₃	$0,186 \pm 0,07^{\text{Db}}$
T ₂ t ₁	$0,538 \pm 0,16^{\text{Bc}}$
t ₂	$0,455 \pm 0,40^{\text{Bc}}$
t ₃	$0,228 \pm 0,13^{\text{Cc}}$
T ₃ t ₁	$0,592 \pm 0,15^{\text{Bc}}$
t ₂	$0,503 \pm 0,02^{\text{Bc}}$

t_3	$0,198 \pm 1,88^{Cb}$
-------	-----------------------

*Médias de três repetições \pm estimativa de desvio padrão

**Letras maiúsculas indicam a diferença dentro da mesma temperatura ao longo do armazenamento (zero: logo após o processamento in natura; t_1 : 2 meses de armazenamento; t_2 : 4 meses de armazenamento; t_3 : 6 meses de armazenamento), ao nível de 5 % de significância

***Letras minúsculas indicam a diferença das diferentes temperaturas (T_1 : -10°C; T_2 : -18° e T_3 : -80°C)

4.7 Conteúdo de carotenóides individuais

Na polpa de amora-preta recém processada foram identificados os carotenóides β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, β -caroteno e licopeno. Estes carotenóides apresentaram boa resolução em coluna de fase reversa RP- C18 (fase estacionária apolar). Porém, nas mesmas condições cromatográficas, a zeaxantina e a luteína não foram separadas, e portanto, foram quantificadas conjuntamente (Fig. 12).

Estes dados concordam com os estudos de Sander, Sharpless e Pursch (2000), que citam que colunas de fase reversa C18 e C30 vêm sendo amplamente utilizadas para separação de carotenóides, porém, em coluna C18 monomérica não ocorre a separação de isômeros geométricos (cis-trans) de carotenóides apolares e entre a luteína e a zeaxantina.

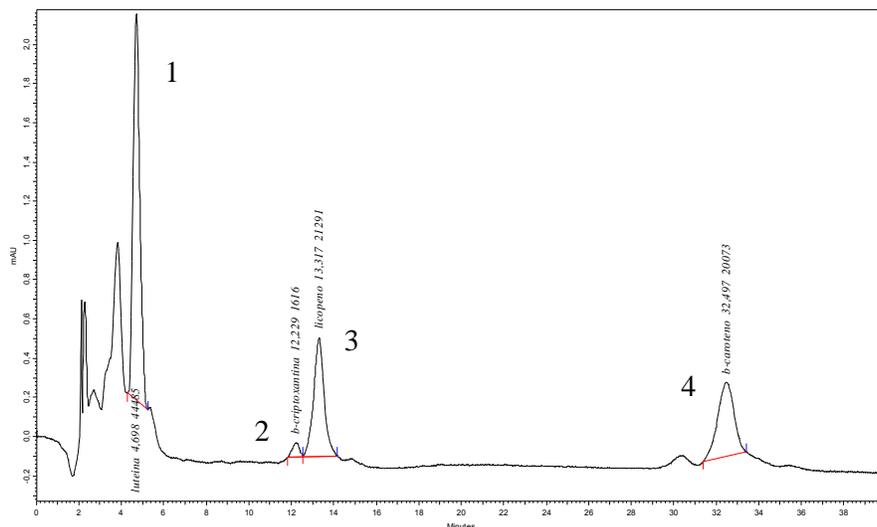


Figura 12 - Cromatograma dos carotenóides individuais em amora-preta cv. Tupy obtido por Clae, com coluna em fase reversa e detector UV (450 nm); 1: luteína+zeaxantina, 2: beta-criptoxantina; 3: licopeno; 4: beta caroteno. Gradiente de metanol:acetoneitrila e acetato de etila, com fluxo de 1,0mL/min

O somatório do conteúdo inicial dos carotenóides individuais na polpa no tempo zero foi de 0,764mg carotenóides.100g⁻¹fruta, sendo um pouco inferior ao conteúdo encontrado para carotenóides totais (0,877mg.100g⁻¹) (tab. 12). Esta diferença se explica porque na determinação de carotenóides totais são quantificados todas as formas de carotenóides existentes na amostra, e na determinação dos carotenóides individuais apenas são identificados os picos com padrões específicos, sendo que alguns não são identificados, e portanto, não são quantificados.

O conteúdo de carotenóides individuais apresentou grandes perdas, assim como o conteúdo de carotenóides totais, durante o período de armazenamento, ficando em torno de 80% na polpa armazenada por 6 meses nas temperaturas de -10 e -18°C, demonstrando a alta sensibilidade destes pigmentos ao armazenamento congelado. Na temperatura de -80°C as perdas foram significativas nos 6 meses de armazenamento, porém quando comparado com as temperaturas de -10 e 18°C, elas foram menores, ficando em torno de 62%. Nos 2 primeiros meses à -80°C, não houveram perdas e sim um leve acréscimo passando de 0,764 à 0,776mg.100g⁻¹, porém não foi significativo. O teor de β-criptoxantina da polpa de amora-preta logo após processada foi de 0,227mg.100g⁻¹, sendo que ao longo do armazenamento houveram perdas em torno de 80% nas temperaturas de -10°C e -18°C. Costa et al. (2003) encontraram para polpa congelada de acerola, redução de β-criptoxantina de 61% após dez meses de estocagem em uma temperatura de -10°C, sendo estas perdas inferiores ao encontradas neste estudo. De acordo com Rodriguez-Amaya (1999), a estabilidade dos carotenóides difere bastante nos alimentos, mesmo quando submetidos a processamento e condições de estocagem idênticas. A principal causa de destruição dos carotenóides é devido sua oxidação (enzimática ou não-enzimática).

Costa et al. (2003) encontraram na polpa de acerola, uma maior instabilidade de β-criptoxantina em relação ao β-caroteno, o que também, foi observado neste estudo com a amora-preta, já que as perdas de β-caroteno permaneceram praticamente estáveis durante todo o armazenamento, diferente do comportamento observado na β-criptoxantina, parecendo ser este composto (β-caroteno) menos influenciável pela temperatura de armazenamento do que os demais.

O teor de β -caroteno apresentou perdas em torno de 33% ao longo do armazenamento, nas três temperaturas avaliadas (-10°C , -18°C e -80°C). Estas perdas são bem diferentes ao encontrado por Cavalcante (1991), que avaliou a estabilidade dos carotenóides na polpa de pitanga laranja após o congelamento lento (-10°C) e estocagem por 90 dias, o qual relata perdas β -caroteno de 63 % na estocagem por 30 dias, sem alteração significativa após esse período. Essa diferença pode ser porque esse pigmento se encontra em pequena quantidade na amora-preta, mas em grande quantidade na pitanga ou ainda, pela proteção de outros compostos presentes na amora-preta, que atuariam como antioxidantes protegendo os carotenóides da oxidação.

O teor de luteína mais zeaxantina encontrados na amora-preta ($0,519 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) logo após processada na forma de polpa, são superiores ao encontrada por Rosso e Mercadante (2005) para acerola ($0,100\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$), porém estes autores quantificaram a luteína isoladamente. Observou-se que houve uma degradação significativa nas temperaturas de -10°C e -18°C , sendo de 23% e 59% respectivamente, nos primeiros dois meses de armazenamento. No sexto mês de armazenamento as perdas praticamente duplicaram quando comparado aos dois primeiros meses. Na temperatura de -80°C não houve perdas na polpa armazenada por 2 meses, porém no final do período de armazenamento o conteúdo de zeaxantina mais luteína reduziu a metade ($0,247\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$).

Com relação ao licopeno, pode-se observar que nenhuma temperatura de armazenamento foi suficiente para evitar as perdas destes compostos. Porém, até os 6 meses de armazenamento não houve diferença nos armazenamentos de -18°C e -80°C , ficando as perdas em torno de 50% em ambas temperaturas no final deste período. O licopeno é composto por onze ligações conjugadas e duas ligações duplas não conjugadas, e por isso, é considerado como o carotenóide que possui uma das maiores capacidades seqüestrantes do oxigênio singlete (SHAMI; MOREIRA, 2004), podendo assim explicar sua grande degradação logo nos 2 primeiros meses de armazenamento em todas as temperaturas.

Salienta-se que as amostras relativas ao segundo tempo do experimento ($t_2=4$ meses) foram perdidas devido a problemas na etapa de saponificação, não havendo mais amostras para realizar estas análises.

Tabela 13 - Carotenóides individuais em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.

Carotenóides (mg.100g ⁻¹)						
Temperatura /tempo	β-Criptoxantina	Luteína + Zeaxantina	β-caroteno	Licopeno	Total	
0	0,227 ^{Aa}	0,519 ^{Aa}	0,003 ^{Aa}	0,015 ^{Aa}	0,764 ^{Aa}	
T ₁	t ₁	0,194 ^{Bb}	0,209 ^{Bb}	0,002 ^{Aa}	0,001 ^{Bb}	0,406 ^{Bb}
	t ₂	****	****	****	****	****
	t ₃	0,025 ^{Cb}	0,124 ^{Cb}	0,002 ^{Aa}	0,005 ^{Cb}	0,156 ^{Cb}
T ₂	t ₁	0,195 ^{Bb}	0,395 ^{Bc}	0,003 ^{Aa}	0,008 ^{Bc}	0,601 ^{Bc}
	t ₂	****	****	****	****	****
	t ₃	0,022 ^{Cb}	0,121 ^{Cb}	0,003 ^{Aa}	0,008 ^{Bc}	0,154 ^{Cb}
T ₃	t ₁	0,247 ^{Aa}	0,519 ^{Aa}	0,003 ^{Aa}	0,007 ^{Bc}	0,776 ^{Ba}
	t ₂	****	****	****	****	****
	t ₃	0,029 ^{Bb}	0,247 ^{Bc}	0,003 ^{Aa}	0,008 ^{Cc}	0,287 ^{Cc}

*Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão

**Letras maiúsculas indicam a diferença dentro da mesma temperatura ao longo do armazenamento (zero: logo após o processamento in natura; t₁: 2 meses de armazenamento; t₂: 4 meses de armazenamento; t₃: 6 meses de armazenamento), ao nível de 5 % de significância

***Letras minúsculas indicam a diferença das diferentes temperaturas (T₁:-10°C; T₂:-18° e T₃: -80°C) .

****não quantificados

4.8 Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante inicial apresentada pela polpa de amora-preta foi de 253,03mg de trolox.100g⁻¹ de fruta (tab. 14), sendo superior ao encontrado por Kuskoski et al. (2005) que foi de 118,9mg de trolox.100g⁻¹ de fruta. A capacidade antioxidante da polpa de amora-preta apresenta-se superior as relatadas para polpas de uva (161,5mg de trolox.100g⁻¹fruta), açaí (163, mg de trolox.100g⁻¹fruta), manga (224,7mg de trolox.100g⁻¹fruta) e goiaba (120mg de trolox.100g⁻¹fruta), e inferiores as relatadas para polpas de acerola (1198,9 mg de trolox.100g⁻¹fruta), demonstrando que a amora-preta consiste em uma fonte rica de compostos antioxidantes, o que é demonstrado pelo seu elevado conteúdo de compostos fenólicos e antociânicos.

Durante os 2 primeiros meses de armazenamento não ocorreram diferenças significativas na capacidade antioxidante das polpas nas três temperaturas de congelamento, quando comparado com a polpa recém processada.

As temperaturas de -10°C , -18°C e -80°C foram suficientes para não alterar o poder antioxidante até 2 meses de armazenamento, e somente na temperatura de -80°C não ocorreu diferenças significativas ao nível de 5% de significância no final dos 6 meses de armazenamento.

Tabela 14 - Capacidade Antioxidante em polpa de amora-preta cv. Tupy estocada sob diferentes temperaturas de congelamento.

Temperatura /tempo		Capacidade Antioxidante (mg de trolox.100g ⁻¹ fruta)
	0	253,03±4,95 ^{Aa}
T ₁	t ₁	243,98±10,4 ^{Aa}
	t ₂	176,64±7,24 ^{Bb}
	t ₃	153,67±0,90 ^{Cb}
T ₂	t ₁	251,40±37,00 ^{Aa}
	t ₂	217,52±24,00 ^{Aa}
	t ₃	155,92±10,60 ^{Bb}
T ₃	t ₁	252,01±31,80 ^{Aa}
	t ₂	243,53±8,5 ^{Aa}
	t ₃	202,05±1,46 ^{Aa}

*Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão

**Letras maiúsculas indicam a diferença dentro da mesma temperatura ao longo do armazenamento (zero: logo após o processamento; t1: 2 meses de armazenamento; t2: 4 meses de armazenamento; t3: 6 meses de armazenamento), ao nível de 5 % de significância

***Letras minúsculas indicam a diferença das diferentes temperaturas (T1:-10°C; T2:-18° e T3: -80°C) ao longo do armazenamento.

5. CONCLUSÃO

Os sólidos solúveis não se alteraram até 4 meses de armazenamento nas temperaturas estudadas (-10°C , -18°C e -80°C) na polpa de amora-preta.

A acidez titulável permanece constante por 2 meses de armazenamento nas temperaturas de -10°C e -18°C , e à -80°C não apresenta alterações em 6 meses de estocagem.

O pH sofre alterações logo nos 2 primeiros meses de armazenamento nas três temperaturas estudadas (-10°C, -18°C e 80°C).

O conteúdo dos compostos fenólicos totais permanecem constantes na polpa de amora-preta cv.Tupy, durante 4 meses de armazenamento.

Os compostos antociânicos totais permanecem sem diferença nos 6 meses de armazenamento à -80°C, já à -10°C e -18°C só permanecem constantes até 2 meses.

Os compostos fenólicos individuais demonstraram-se instáveis em todas as temperaturas de armazenamento, sendo o ácido ferúlico o mais instável.

Os tocoferóis foram degradados em 2 meses de armazenamento nas temperaturas de -10°C e -18°C. A temperatura de -80°C foi suficiente somente nos 2 primeiros meses para evitar degradações.

O ácido ascórbico foi degradado em todas as temperaturas, atingindo perdas de 100 % nas temperaturas de -10°C e -18°C aos 6 meses de estocagem.

Os carotenóides apresentaram alterações em todas temperaturas e tempos de armazenamento das polpas.

O poder antioxidante das polpas de amora-preta não foram alteradas durante 2 meses de armazenamento nas temperaturas deste estudo (-10°C, -18°C e -80°C), mas permanece com a mesma capacidade após o período de estocagem apenas na temperatura de -80°C.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI-COSTA, T. S.; ABREU, L. N.; ROSSETI, A. G. Efeito do congelamento e do tempo de estocagem da polpa de acerola sobre o teor de carotenóides. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.1, p. 56-58, 2003.

ANDRADE, N. J.; MARTYN, M. E. L. **Limpeza sanitização na indústria de alimentos**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa,. 1996. 39p. no. 142.

ANDRADE, S.R.R.; PORTO,E.; SPOTO,H.F. Avaliação da qualidade do caldo extraído de toletes de cana-de-açúcar minimamente processada, armazenados sob diferentes temperaturas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.28; 2008

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

ANTUNES, L.E.; RASEIRA, M.C.B. Aspectos Técnicos da Cultura da Amora-preta ISSN 1806-9193 Junho, 2004.

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

ARAÚJO, P.G.L.; FIGUEIREDO, R.W.; ALVES, R.E.; MAIA, G.A.; PAIVA, J.R. β -caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira conservada por congelamento durante 12 meses. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.104-107, 2007.

ARAUJO, P. G. L.; FIGUEIREDO, R. W.; ALVES, R. E.; MOURA, C. H. M. Estabilidade da polpa de frutos de novos clones de aceroleira conservada por congelamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19., 2004. Recife. **Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Recife: CBCTA, 2004. CD-ROM.

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D.S.; BAISCH, A.L.M.; SOUZA-SOARES, L.A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, v.13, p.105-114, 2003.

BANWART, G. J. **Basic food microbiology**. 2.ed. New York:Van Nostrand Reinhold, 1989. 774p.

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

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

BALL, G. F. M. Vitamin E. **Bioavailability and analysis of vitamin in foods**, p.195-239, 1998.

BIANCHINI, R., PENTEADO, M.V.C. **Vitamina E. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, p.23-164, 2003.

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

BRAND-WILLIAMS; CUVELIER, M.E.; BERSER,C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant. **Activity Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 28, p.25-30, 1995.

BURNS, J. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal Agric. Food Chemistry**, v.49, p. 5797-5808, 2001.

CAVALCANTE, M. L. **Composição de carotenóides e valor de vitamina A em pitanga (*Eugenia uniflora*) e acerola (*Malpighia glabra L.*)**. 1991. 87f.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Ctenas A, *et al.* Crescendo com Saúde. 1ª ed. C2 Editora e Consultoria em Nutrição, 2000. Disponível em <<http://www.crescendocomsaude.com.br>>.

CHAVES, M.C.V.; GOUVEIA, J.P.G.; ALMEIDA, F.A.C.; ARAÚJO, J.C. Caracterização físico-química do suco da acerola. **Revista de biologia e ciências da terra**. v.4, n.2, p.1519-5228, 2004.

CHEFTEL, J.C.; CHEFTEL, H.; BESANÇON, P. Métodos de conservación. In: CHEFTEL, J.C.; CHEFTEL, H.; BESANÇON, P.(Ed.) **Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos**. 1983. v. 2, cap.7, p.173-202.

CHIM, J.F. **Caracterização de compostos bioativos em amora-preta (Rubus sp.) e sua estabilidade no processo e armazenamento de geléias convencional e light**. 2008. 86f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CHUN, J.; LEE, J.; YE, LIN; EXLER, J.; EITENMILLER, R.R. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.196–204, 2006.

COSTA, A. T.S.; ABREU, L.N.; GUIMARÃES, A. G. Efeito do congelamento e do tempo de estocagem da polpa de acerola sobre o teor de carotenóides. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.1, p. 56-58, 2003.

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

DAUBENY, H.A. Brambles. **Fruit Breeding**. New York: John Wiley & Sons, 1996. p.109-190.

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

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

ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A.; RODRIGO, C.; RODRIGO, D. Effect of storage period under variable conditions on the chemical and physical composition and colour of Spanish refrigerated orange juices. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, n.9, p. 1413-1422, 2005.

FENNEMA, O.R. Química de los alimentos. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993

FILHO, S.; PEREIRA, A.P.S.; BAYMA, J.C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta daninha**, v.23, n.1, 2005.

Fontana JD, Mendes SV, Persiķe DS, Peracetta LF, Passos M. Carotenóides Cores Atraentes e Ação Biológica. 11 Prêmio Paranaense em C&T 1997. Disponível em <<http://www.herbario.com.br/dataherb06/1112carotenoid.htm>>.

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

GRANGEIRO, L.C.; PEDROSA, J.F.; BEZERRA NETO, F; NEGREIROS, M.Z. de. Qualidade de híbridos de melão-amarelo em diferentes densidades de plantio. **Horticultura Brasileira**, v.17, p.110-113, 1999.

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

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3 ed. São Paulo, 1985, v. 1, 533p.

JACQUES, A. **Amora-preta**. Pelotas, 2008. 1 fot. (6,06 X 9,08cm), color.

JACQUES, A.C.; PERTUZATTI, P.B.; ZAMBIAZI, R.C. Comparação entre dois métodos para determinação de fenóis totais na amora-preta (*rubus* spp). **Anais do congresso de iniciação científica XVI**, Pelotas, 2007.

KIMBALL, D.A. **Citrus processing quality control and technology**. New York: AVI Book, 1991. 473p.

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

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO; FETT, R. 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.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G ; MORALES, M.T. FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

LAYRISSE, M. New property of vitamin A and β -carotene on human iron absorption: effect on phytate and polyphenols as inhibitors of iron absorption. **Arch. Latinoam. Nutr.**, Guatemala, v. 50, p.243-248, 2000.

LEE, J.; YE, L.; LANDEN, W.O.; EITENMILLER, R.R. Optimization of an Extraction Procedure for the Quantification of Vitamin E in Tomato and Broccoli using Response Surface Methodology. **Journal of food composition and analysis**, v.13, p.45-57, 2000.

LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analysis in Cranberries. **Hortiscience**, v.7, n.1, p.83-84, 1972.

LIMA, V. L. A.; GUERRA, N. B. Antocianinas: atividade antioxidante e biodisponibilidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.37, p. 121-128, 2003.

LIMA, V.L.A.G.; MELO, E.A.M.; MACIEL, M.I.S.; PRAZERES, F.G. MUSSER, R.S.; LIMA, D.E.S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chemistry**, v.90, p.565–568, 2005.

LINS, R.T. **Determinação de tocoferóis e carotenóides em frutas amazônicas: Implantação de uma metodologia**. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Centro Tecnológico, Universidade Federal do Pará, Pará.

MAIA, G.A.; MESQUITA FILHO, J.A.; BARROSO, M.A.T.; FIGUEIREDO, R.W. Características físicas e químicas da ata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.21, n.10, p.1073-1076, 1986.

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

MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **B. Ceppa**, v.22, n.2, p.233-252, 2004.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F.; HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. **Journal of Food Composition and analysis**. p.370-374; 2006.

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chemistry**, v.25, p.207-225, 1987.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.36, n.1, p.1-11, 2002.

MOTA, R.V. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DE GELÉIA DE AMORA-PRETA. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v.26, n.3, p.539-543, 2006.

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

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 881, p.543-555, 2000.

OLIVEIRA, M.E.B.; BASTOS, M.S.R.; FEITOSA, M.; BRANCO, A.A.C.; SILVA, M.G.G. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas

congeladas de acerola, cajá e caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.9, n.3, 1999.

PACHECO, M. A. S. R.; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, H. G. G.; CÂNDIDO, V. L. P.; GOMES, A. H. S.; ARMELIN, I. M.; BERNARDES, R. Condições higiênico-sanitárias de verduras e legumes comercializados no CEAGESP de Sorocaba-SP. **Higiene Alimentar**, v.16, n. 101, p.50-55, 2002.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Pequenas frutas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Vacaria, RS. **Anais do Seminário Brasileiro Sobre Pequenas Frutas**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2003, p.7-15.

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

PINHEIRO, R.V.R.; MARTELETO, L.O.; SOUZA, A.C.G. de; CASALI, W.D.; CONDÉ, A.R. Produtividade e qualidade dos frutos de dez variedades de goiaba, em Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, visando ao consumo ao natural e à industrialização. **Revista Ceres**, v.31, p.360-387, 1984.

POLTRONIERI, E. Alternativas para o mercado interno de pequenas frutas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Vacaria, RS. **Anais do Seminário Brasileiro sobre Pequenas Frutas**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2003, p.37-40.

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

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

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

ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) from two harvests. **Food Research International**, v.38, p.1073-1077, 2005.

SANDER, L. C.; SHARPLESS, K. E.; PURSCH, M. C30 stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. **Journal Chromatography**, v.880, p.189-202, 2000.

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

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

SETIADIA, D. H. Vitamin E models. Shortened side chain models of a, b, g and d tocopherol and tocotrienol: a density functional study. **J Mol Struct**, v.637, p.11-26, 2003.

SGARBIERI, V. C. Nutrição e tecnologia de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, p.115-139, 1986.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutrição**, v.17, n.2, p.227-236, 2004.

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

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

SIQUEIRA, F. M. Nutrientes antioxidantes. **Ciência e Tecnologia Agroindustrial**, v.31, n.2, p.192-199,1997.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R.E. Polyphenolic Composition of Marion and Evergreen Blackberries. **Journal of food science**, v. 69, n. 4, 2004.

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

SPEIRS, J.; BRADY, C.J. Modification of gene expression in ripening fruit. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.519-532, 1991.

THAKUR, B. R.; ARYA, S. S. Relative suitability of plastic films for the frozen storage of mango pulp. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.12, n.3, p.171-178, 1988.

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

VATTEM, D.A. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. **Process Biochem**, v.40, p.1583–1592, 2005.

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

VITAMINA E imagem. Disponível em:<www.hipocampo.org/images_art/tocoferol.gif>
Acesso em: 22 nov. 2008.

WELCH R. W. et. al. Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. **Journal Biology Chemistry**, v.270, n.21, p. 84-92, 1995.

YAMASHITA, F.; BENASSI, M. T.; TONZAR, A. C.; MORIYA, S.; FERNÁNDEZ, J. G. Produtos de acerola: estudo da estabilidade de vitamina C. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.1, p.92-94, 2003.

ZAMBLAZI, R.C. **The role of endogenous lipid components on vegetable oil stability**. 1997. 304f. Tese (Doutorado em Foods and Nutritional)- Sciences Interdepartmental Program. University of Manitoba Winnipeg, Manitoba, Canada.
ZHANG, D; HAMAUZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. **Food Chemistry**, v.88, p.503-509, 2004.