BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos alimentos
Área de Bromatologia

**Efeito do armazenamento de polpas de frutas congeladas
sobre os teores de flavonóides, vitamina C e atividade
antioxidante**

Ricardo José dos Santos

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

**Orientadora:
Profa. Dra. Maria Inés Genovese**

**São Paulo
2005**

18201

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010968

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S237e	Santos, Ricardo José dos
	Efeito do armazenamento de polpas de frutas congeladas sobre os teores de flavonóides, vitamina C e atividade antioxidante / Ricardo José dos Santos. -- São Paulo, 2005. 71p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Genovese, Maria Inês
	1. Alimento : Composto fenólico : Ciência dos alimentos 2. Antioxidante : Nutrição 3. Vitamina C : Ciência dos alimentos I. T. II. Genovese, Maria Inês, orientador.
	641 CDD

O covarde nunca tenta,
o fracassado nunca termina,
o vencedor nunca desiste.

Norman Vincent Peale

Dedico este trabalho

Em especial, aos meus pais Mário e Eliete

Aos meus irmãos Rosângela, Júnior e Ronaldo

pelo incentivo enorme que tive em toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Mário e Eliete, aos meus irmãos, Rosângela, Júnior e Ronaldo pela cumplicidade, pelo apoio e principalmente pela compreensão da minha ausência em alguns momentos do convívio familiar.

Agradeço a professora Maria Inés Genovese pela oportunidade, dedicação e por dividir comigo sua larga experiência.

Agradeço a Prof^a. Beatriz pela presença e apoio constantes.

Ao professor João Roberto, agradeço pelos conselhos sobre assuntos diversos.

Ao professor Eduardo pelas valiosas sugestões durante a realização deste trabalho.

Obrigado também aos professores do Departamento de Alimentos, Prof^a. Elizabeth, Prof. Franco Lajolo que em algum momento me brindaram com seu auxílio.

Ao pessoal da Secretaria do departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Mônica e Tânia, e da Secretaria de Pós-graduação, Jorge e Elaine, sempre solícitos e gentis.

Agradeço aos meus amigos:

Ao Joaquim Maurício pelas palavras sábias, pelo incentivo e principalmente pelo apoio técnico.

Ao Adair Vieira Júnior, esse é o cara.

Ao Renato Astorino Filho pela grande amizade e também pelas caronas.

Ao João Paulo Fabi pelas idas e vindas ao bandeirão e botequinho.

A Ana Cris, Neuza, Marcinha e Malu pela amizade, carinho, incentivo, apoio, calorosas e elucidativas discussões e também pela oportunidade de dividirmos a bancada ou pelo menos tentar.

Ao Alberto, Márcia e Lúcia que sempre estiveram dispostos a ajudar e a criar um ambiente descontraído, facilitando o trabalho diário.

E meus sinceros agradecimentos a todos os colegas de trabalho, Ana Tereza, Aderuza, Adriana, Alexandre, Amanda, Ana Paula, Andréia, Carioca, Cíntia, Denise, Eliana, Fernandas (as três), Giselli, Graci, Grazi, Janaína, Jacqueline, Lena, Marcelo, Milana, Paola, Patrícia, Priscila, Rodrigo, Rose, Tânia, Yona e Walter.

Ao Projeto Sítio do Bello por me ceder as polpas de frutas, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Obrigado também à CAPES, pela bolsa de estudos e à FAPESP, pelo suporte financeiro dado ao laboratório.

A todos vocês muito obrigado !!!!!!!

RESUMO

As frutas deteriorarem-se em poucos dias, tendo sua comercialização *in natura* dificultada a grandes distâncias. Além disso, estima-se que as perdas pós-colheita variem de 15 a 50% do total. Desta forma, a produção de polpas de frutas congeladas se tornou um meio favorável para o seu aproveitamento integral na época da safra, evitando os problemas ligados à sazonalidade. Os flavonóides e o ácido ascórbico presente em frutas apresentam atividade antioxidante, associada à menor incidência de crônico-degenerativas. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito do armazenamento em condições comerciais (-18 °C) de polpas de frutas (acerola, açaí, amora e morango) e o efeito do processamento artesanal para sua obtenção sobre os teores de flavonóides, vitamina C e atividade antioxidante *in vitro*. A composição dos flavonóides e os teores de vitamina C foram determinados por CLAE, o teor de fenólicos totais através do método Folin-Ciocalteu, e a atividade antioxidante pelo método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e através do seqüestro de radicais livres do DPPH. Os resultados mostraram que o efeito do processamento para obtenção das polpas de frutas congeladas sobre os teores de compostos fenólicos e vitamina C varia de acordo com o fruto. No caso do morango e da amora, as polpas apresentaram teores similares aos seus respectivos frutos. Já para acerola, a separação do epicarpo e das sementes durante o processo de despulpamento ocasionou um aumento do teor de vitamina C e diminuição do teor de flavonóides na polpa. O armazenamento de polpas congeladas de morango, amora, açaí e acerola em condições comerciais (-18 °C), por até um ano, não afeta os teores de flavonóides, vitamina C, fenólicos totais e atividade antioxidante.

PALAVRAS-CHAVE: flavonóides; ácido ascórbico; atividade antioxidante; polpa de fruta; armazenamento.

ABSTRACT

The fruits become deteriorated in few days, therefore their commercialization is difficult for long distances. Thus, production of frozen fruits pulps become a favorable method for utilization of the integral fruit. The fruits containing flavonoids and ascorbic acid that are bioactive compounds that present antioxidant activity due to their ability of reducing the formation of free radicals, besides the possible effects in reducing the incidence of chronic degenerative diseases. The objective of this work was to verify the effect of the storage at commercial conditions (-18°C) of frozen fruits pulps (acerola, açaí, blackberry and strawberry) and the effect of the artisan processing on the flavonoids, vitamin C contents and antioxidant activity. Flavonoids and vitamin C contents were determined by HPLC, total phenolics contents through the Folin-Ciocalteu method, and the antioxidant activity was evaluated by the linoleic acid/ β -carotene system and by measuring DPPH free-radical scavenging capacity. The results showed that the effect of processing for obtainment of frozen fruits pulps on total phenolics and vitamin C changed according to the fruit analysed. The fruits pulps of strawberry and blackberry showed similar contents to their respective fruits. In acerola, epicarp and seeds separation during the processing increased the vitamin C contents and decreased the flavonoids contents in pulp. In conclusion, the storage of frozen fruits pulps of acerola, açaí, strawberry and blackberry at commercial conditions (-18°C) during a year, did not affect the flavonoids, vitamin C, phenolics total contents and antioxidant activity.

KEYWORDS: flavonoids; ascorbic acid; antioxidant activity; fruit pulp; storage.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Determinação de umidade	16
3.2. Determinação de flavonóides	16
3.2.1. Extração	16
3.2.2. Extração em fase sólida	17
3.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	17
3.3. Determinação de fenólicos totais	18
3.4. Atividade antioxidante	19
3.4.1. Sistema β-caroteno/ácido linoléico	19
3.4.2. Seqüestro de radicais livres	20
3.5. Determinação de vitamina C	21
3.6. Análise dos resultados	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Teores de umidade dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas	23
4.2. Teores de vitamina C dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas	26

4.3. Teores de flavonóides dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas	30
4.4. Teores de fenólicos totais dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas	39
4.5. Atividade antioxidante dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas	43
4.5.1. Sistema β -caroteno/ácido linoléico	43
4.5.2. Sequestro dos radicais DPPH	48
5. CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
7. ANEXOS	62

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.	Teores de umidade dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas	25
TABELA 2.	Teores de vitamina C dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18°C)	29
TABELA 3.	Teores de flavonóides (mg aglicona/ 100 g amostra (b.u.)) da acerola (<i>Malpighia sp.</i>) e de suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).	32
TABELA 4.	Teores de flavonóides (mg aglicona/ 100 g amostra (b.u.)) e ácido elágico livre do morango (<i>Fragaria x ananassa</i>) e de suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).	34
TABELA 5.	Teores de flavonóides (mg aglicona/ 100 g amostra (b.u.)) do açaí (<i>Euterpe oleracea</i>) e de suas respectivas polpas congeladas antes e após 6 meses de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).	36

TABELA 6.	Teores de flavonóides (mg aglicona/ 100 g amostra (b.u.)) e ácido elágico livre da amora (<i>Rubus ssp.</i>) e de suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).	38
TABELA 7.	Teores de fenólicos totais dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18°C).	42
TABELA 8.	Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18°C).	47
TABELA 9.	Determinação da atividade antioxidante pelo seqüestro dos radicais DPPH dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18°C).	51

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Estruturas de representantes das principais classes de flavonóides.	6
FIGURA 2.	Biossíntese geral dos flavonóides	9
FIGURA 3.	Esquema da reação de oxidação do ácido ascórbico a ácido desidroascórbico, com a formação do radical ascorbila como composto intermediário	12
FIGURA 4.	Resposta do ácido ascórbico ao método Folin-Ciocalteu	39
FIGURA 5.	Capacidade pró-oxidante do ácido ascórbico determinada pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico.	44
FIGURA 6.	Capacidade antioxidante da catequina, pró-oxidante do ácido ascórbico e interação entre a catequina e o ácido ascórbico determinada pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico.	45
FIGURA 7.	Capacidade antioxidante do ácido elágico, catequina e quercetina a 500 μM determinada pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico.	46
FIGURA 8.	Atividade antioxidante de quercetina, ácido ascórbico e catequina a 50 μM expresso em porcentagem de seqüestro de radicais livres (% SRL).	49

Anexos

- FIGURA A 1.** Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica da acerola (*Malpighia sp.*) *in natura* através da detecção a 525 nm. Cy; Pg: glicosídeos de cianidina e pelargonidina, respectivamente. 62
- FIGURA A 2.** Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanol:amônia da acerola (*Malpighia sp.*) *in natura* através da detecção a 270 nm. Cy; Pg; Q; K: glicosídeos de cianidina, pelargonidina, quercetina e caempferol, respectivamente. 62
- FIGURA A 3.** Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica do morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) *in natura* através da detecção a 525 nm. Cy; Pg: glicosídeos de cianidina e pelargonidina., respectivamente. 63
- FIGURA A 4.** Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica do morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) *in natura* através da detecção a 270 nm. Cy; Pg; Q; K: glicosídeos de cianidina, pelargonidina, quercetina e caempferol, respectivamente. Ae: ácido elágico livre. 63
- FIGURA A 5.** Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanol:amônia do morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) *in natura* através da detecção a 270 nm. Q; K: glicosídeos de quercetina e caempferol, respectivamente. Ae: ácido elágico livre. 64

- FIGURA A 6.** Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica do açaí (*Euterpe oleracea* Martius) *in natura* através da detecção a 525 nm. Cy: glicosídeo de cianidina. 64
- FIGURA A 7.** Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica do açaí (*Euterpe oleracea* Martius) *in natura* através da detecção a 270 nm. Cy; Lt: glicosídeos de cianidina e luteolina, respectivamente. 65
- FIGURA A 8.** Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanol:amônia do açaí (*Euterpe oleracea* Martius) *in natura* através da detecção a 525 nm. Cy: glicosídeo de cianidina. 65
- FIGURA A 9.** Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanol:amônia do açaí (*Euterpe oleracea* Martius) *in natura* através da detecção a 270 nm. Lt: glicosídeo de luteolina. 66
- FIGURA A 10.** Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica da amora-preta (*Rubus ssp.* L.) *in natura* através da detecção a 525 nm. Cy: glicosídeo de cianidina. 66

FIGURA A 11. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica da amora-preta (*Rubus ssp. L.*) *in natura* através da detecção a 270 nm. Cy; Q: glicosídeos de cianidina e quercetina, respectivamente. Ep: epicatequina.

67

FIGURA A 12. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanol:amônia da amora-preta (*Rubus ssp. L.*) *in natura* através da detecção a 525 nm. Cy: glicosídeo de cianidina.

67

FIGURA A 13. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanol:amônia da amora-preta (*Rubus ssp. L.*) *in natura* através da detecção a 270 nm. Q: glicosídeo de quercetina. C; Ae: catequina e ácido elágico livre, respectivamente.

68

ABREVIATÖES

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD – (*Diode Array Detector*) detector com arranjo de diodo

AA – Ácido ascórbico

ADHA – Ácido desidroascórbico

RA – Radical ascorbila

BHA - Butil-hidroxiانىsol

BHT - Butil-hidroxitolueno

DPPH - 2,2-difenil-1-picriLhidrazil

Tween 40 - Monopalmitato de polioxietilenosorbitana

DTT - Ditiotreitol

% SRL – Porcentagem de seqüestro de radicais livres

1. INTRODUÇÃO

As frutas, por serem perecíveis, deteriorarem-se em poucos dias, tendo sua comercialização *in natura* dificultada a grandes distâncias. Além disso, estima-se que as perdas pós-colheita variem de 15 a 50% do total. Desta forma, a produção de polpas de frutas congeladas se tornou um meio favorável para o aproveitamento integral das frutas na época da safra evitando os problemas ligados à sazonalidade (BARRET *et al.*, 1994).

A legislação brasileira do Ministério da Agricultura define polpa de fruta como o produto não fermentado, não concentrado, não diluído, obtido pelo esmagamento de frutos polposos, através de um processo tecnológico adequado, com um teor mínimo de sólidos totais proveniente da parte comestível do fruto, específico para cada um. As polpas devem ser preparadas com frutas sãs, limpas, isentas de matéria terrosa, de parasitas e detritos de animais ou vegetais. Não devem conter fragmentos das partes não comestíveis da fruta. No rótulo da embalagem do produto deve constar a denominação “polpa”, seguido do nome da fruta de origem, além da data de fabricação e prazo de validade. As características físicas, químicas e organolépticas devem corresponder às provenientes do fruto de sua origem. A necessidade de descascamento e corte varia com a fruta a ser processada. No despolpamento, há a separação das cascas, sementes e outras partes não comestíveis. Esta etapa é realizada em despolpadeira, onde ocorre a passagem da fruta por uma malha de aço inox com diferentes tamanhos de furos para seu refinamento. Após o despolpamento o material deve ser encaminhado para a etapa de congelamento, e esta operação deve ser realizada no menor espaço de tempo possível, a fim de se manter as características originais das frutas. É importante ressaltar que a polpa deve ser mantida congelada até o momento do seu consumo,

e a temperatura recomendada para seu armazenamento varia de - 18 °C a - 25 °C. As polpas de frutas destinadas à industrialização para produção de bebidas, e não destinadas ao consumo direto, podem ser adicionadas de aditivos químicos previstos para a bebida a que se destinam. Em algumas polpas de frutas podem ser adicionados acidulantes como reguladores de acidez e corantes naturais para correção da cor (BRASIL, 2000).

As polpas de fruta têm grande importância como matéria prima em indústrias de iogurtes, doces, biscoitos, bolos, sorvetes, refrescos e alimentos infantis. Atualmente, com a tecnologia disponível, o mercado de polpas de frutas congeladas apresenta um crescimento razoável devido ao grande potencial mercadológico em função da variedade de frutas com sabores bastante agradáveis.

Entre as frutas bastante utilizadas para a produção de polpas encontram-se a amora-preta, o morango, a acerola, e mais recentemente o açaí.

A amora-preta é uma espécie arbustiva do gênero *Rubus* L. (família das Rosáceas), com ramos castanhos e eretos, cobertos de pequenos espinhos. Sua origem não é definida, possuindo características de adaptação climática muito variada, podendo-se encontrar cultivares com exigência de frio. Já foram observadas espécies no Hemisfério Norte e em muitas ilhas oceânicas, comprovando sua ampla adaptação às diferentes condições climáticas. No Brasil, seu cultivo iniciou-se em 1972 no estado do Rio Grande do Sul, com plantas oriundas dos Estados Unidos. A partir de sua implantação no país, a amora-preta vem sendo cultivada em Santa Catarina, São Paulo, Paraná e Minas Gerais, com destaque para o estado introdutor da cultura, sendo o maior produtor nacional, com aproximadamente 700 t /ano (ANTUNES *et al.*, 2000). Os frutos, além de serem consumidos *in natura*, podem ser comercializados para fabricação de doces, geléias, conservas, sucos, fermentos,

polpas, sorvetes, iogurtes, tortas e bolos (BASSOLS; MOORE, 1981). Estudos recentes têm demonstrado o potencial da utilização da amora-preta como uma fonte de corantes naturais de excelente qualidade, devido ao seu conteúdo de antocianinas. Os pigmentos presentes nos frutos são de duas classes principais: carotenóides e flavonóides. Dentre os flavonóides, os derivados da cianidina são as antocianinas de maior interesse, sendo responsáveis pela cores atrativas dos frutos, que variam do vermelho ao violeta (MAATTA-RIIHINEN *et al.*, 2004).

A acerola ou cereja-das-antilhas (*Malpighia glabra* L., *Malpighia puniceifolia* L. ou *Malpighia emarginata* DC.), é uma planta rústica originária das Antilhas, América Central e América do Sul, desenvolvendo-se bem em clima tropical e subtropical. Possui um alto teor de vitamina C, variando de 1.500 a 4.600 mg por 100 g de suco, possui 50 a 100 vezes mais essa vitamina que igual quantidade de suco de limão ou de laranja (ASSIS *et al.*, 2001).

Sua exploração ainda é muito limitada, devido sua curtíssima vida pós-colheita, que não passa de três dias. Por esse motivo, a fruta está sendo utilizada na elaboração industrial de vários produtos como suco natural, suco concentrado, suco liofilizado e polpas congeladas (ARAÚJO; MINAMI, 1994).

A cor vermelha da acerola, no estágio maduro, é devida à presença das antocianinas principalmente no epicarpo do fruto. A cianidina e a pelargonidina são as antocianidinas predominantes (MAZZA; BROUILLARD, 1987).

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é um fruto não climatérico bastante consumido no mundo todo (AVIGDORI-AVIDOV, 1986). É uma boa fonte de carboidratos, vitamina C, antocianinas e outros flavonóides, conseqüentemente possuindo alta capacidade antioxidante (CORDENUNSI *et al.*, 2002). A cor vermelha característica do fruto é devida às antocianinas presentes, sendo importante para a

avaliação da sua maturidade. A principal antocianina encontrada é pelargonidina 3-glucosídeo, com cianidina 3-glucosídeo e pelargonidina 3-rutinosídeo presentes em quantidades menores (CORDENUNSI *et al.*, 2002; GIL *et al.*, 1997).

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Martius) é uma palmeira nativa da Amazônia, sendo seus frutos bastante procurados para a produção de polpa, denominada "vinho de açaí". Este vinho é obtido com adição de água morna para facilitar o despulpamento do fruto, e é muito utilizado na elaboração de sucos e sorvetes. O açaizeiro é uma espécie de grande importância sócio-econômica para o Pará, pois além da polpa obtida do fruto, a planta fornece ainda o palmito, que é muito apreciado em diversas regiões do Brasil. O fruto maduro possui uma coloração escura, tendo um diâmetro que varia entre 1 e 1,5 cm de comprimento (POZO-INSFRAN *et al.*, 2004). O açaí é uma boa fonte de fibras e o suco obtido a partir da polpa congelada contém aproximadamente 2,4 % de proteínas e 5,9 % de lipídios (SILVA, 1996). Com o aumento dos estudos, na tentativa da substituição dos corantes artificiais pelos naturais empregados nos alimentos, o açaí ganhou grande destaque, uma vez que é rico em antocianinas (POZO-INSFRAN *et al.*, 2004).

Os metabólitos secundários, principalmente os compostos fenólicos, desempenham importantes funções nos vegetais, tais como: atração de polinizadores, proteção dos tecidos fotossintetizantes contra os raios ultravioleta, atividade antimicrobiana e atividade antifúngica (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Os flavonóides constituem um dos maiores grupos de fenóis naturalmente presentes nos vegetais, caracterizados por apresentarem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, arranjados em C₆-C₃-C₆ (Figura 1), constituídos por dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia de três átomos de carbono que podem ou não formar um terceiro anel (MARKHAM, 1982). Os flavonóides ocorrem na forma

glicosídica (ligados a carboidratos) ou na forma aglicona (sem carboidrato). Os glicosilados mais comuns ocorrem como O-glicosídeos, nos quais um ou mais grupos hidroxílicos são ligados a um ou mais açúcares. A glicosilação proporciona ao flavonóide menor reatividade e maior solubilidade em água. Os açúcares dos glicosídios mais comumente encontrados são glicose, ramnose, galactose, xilose e arabinose (STAFFORD, 1990).

Os flavonóides são divididos em classes baseando-se no estado de oxidação do anel central C e pela posição da ligação do anel B. Outras alterações na estrutura ocorrem devido a hidrogenação, hidroxilação, metilação, malonilação, sulfatação e glicosilação (PETERSON; DWYER, 1998).

Flavonol	R ₁	R ₂	R ₃
Quercetina	OH	OH	OH
Caempferol	H	OH	OH
Flavona	R ₁	R ₂	R ₃
Luteolina	OH	OH	H
Apigenina	H	OH	H

Flavanona	R ₁	R ₂	R ₃
Hesperitina	OH	OCH ₃	H
Taxifolina	OH	OH	OH
Naringenina	H	OH	H

Flavanol

Catequina

Epicatequina

Isoflavonas	R ₁
Daidzeína	H
Genisteína	OH

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

FIGURA 1. Estruturas de representantes das principais classes de flavonóides.

Cada classe de flavonóides apresenta características próprias, como as antocianinas que variam do vermelho ao roxo, e são responsáveis pela coloração de muitos frutos (morango, acerola, amora e açaí).

Hassimotto *et al.* (2005) observaram que amostras ricas em antocianinas apresentaram alta eficiência na inibição da oxidação do lipossomo e na inibição do descoramento do β -caroteno causado pelos radicais livres formados durante a peroxidação do ácido linoléico. Isto determinou a escolha de polpas de frutas ricas em antocianinas em nosso estudo.

Sabe-se que estas frutas possuem uma imensa variedade de metabólitos secundários ativos, como as antocianinas (BROUILLARD, 1987; CORDENUNSI *et al.*, 2002; MAATTA-RIIHINEN, 2004; MAZZA; POZO-INSFRAN *et al.*, 2004). As antocianinas são pigmentos encontrados em frutas e vegetais e conferem cor vermelha, violeta ou azul. As antocianidinas mais comuns são cianidina, pelargonidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (Figura 1). Os pigmentos antociânicos são geralmente encontrados na forma glicosilada (antocianina), que por hidrólise libera sua forma aglicona (antocianidina). A estrutura das antocianinas varia de acordo com o número e posição de substituintes hidroxila e grupos metoxila no esqueleto básico, e a posição e o tipo do açúcar ligado à estrutura. Os açúcares normalmente encontrados ligados às antocianinas são glicose, ramnose, galactose e arabinose. Os açúcares rutinose (6-O- α -L-ramnosil-D-glucosídeo), soforose (2-O- β -D-glucosil-D-glucosídeo) e sambubiose (2-O- β -D-xilosil-D-glucosídeo) também podem estar presentes (CLIFFORD, 2000).

As antocianinas possuem atividade antioxidante devido ao seu poder de seqüestrar os radicais livres, devido à capacidade de doar elétrons e subsequente estabilização do radical formado. As antocianinas também possuem hidroxilas

vicinais com a propriedade antioxidante de quelar de metais (SATUÉ-GRACIA *et al.*, 1997).

A estrutura e a cor das antocianinas são profundamente afetadas pela natureza de seu ambiente físico-químico, e são particularmente sucessíveis às variações do pH do meio (CLIFFORD, 2000).

Os flavonóis são os flavonóides mais comumente encontrados na natureza e apresentam coloração amarela. Alguns são incolores como os flavanóis, que estão presentes em frutas e chás. As flavonas são predominantes em cereais e ervas, tendo uma coloração ligeiramente amarela. Em frutas cítricas, as flavanonas são os flavonóides predominantes. As isoflavonas são encontradas especificamente nas leguminosas, principalmente soja.

Os flavonóides são compostos aromáticos derivados da fenilalanina e da malonil-coenzima A. Sua biossíntese é considerada mista devido ao envolvimento da via do ácido chiquímico, seguido da extensão da cadeia através da interação com a via do acetato-malonato, que forma o outro anel aromático. Por ação da chalcona sintase é formado o precursor dos flavonóides, a chalcona (VICKERY; VICKERY, 1981).

A chalcona é formada a partir da condensação de três unidades de malonato que formam o anel A (via do acetato-malonato), enquanto que o anel B e os três carbonos do anel central são derivados do ácido *p*-cumárico (via do ácido chiquímico). A partir da chalcona formam-se as principais classes de flavonóides encontrados na maioria das plantas. (VICKERY; VICKERY, 1981) (Figura 2).

FIGURA 2. Biossíntese geral dos flavonóides (WINKEL-SHIRLEY, 2001)

O ácido ascórbico (AA) é uma vitamina hidrossolúvel, sintetizada por plantas e por vários animais, exceto os humanos, alguns roedores e pássaros. Desta forma ela deve ser adquirida a partir da dieta. Quando há deficiência prolongada dessa vitamina na dieta dos humanos, pode ocorrer uma doença conhecida como escorbuto. O termo vitamina C é usado para descrever genericamente todos os compostos que apresentam quantitativamente a atividade biológica do ácido ascórbico frente ao escorbuto. O escorbuto é normalmente decorrente da baixa ingestão de frutas frescas e vegetais verdes, que são as melhores fontes de vitamina C (VOET; VOET, 1994).

A vitamina C é uma molécula ácida com forte atividade redutora, derivada de hexoses e é essencial na maioria dos tecidos. O ácido ascórbico é facilmente absorvido no intestino humano por um mecanismo ativo e provavelmente por difusão é transportado para o sangue. Essa vitamina é armazenada até certa quantidade em tecidos como o fígado e o baço. A presença de grandes quantidades de vitamina C não absorvida pode causar diarreia osmótica e desconfortos intestinais (ROCK *et al.*, 1996).

O ácido ascórbico também se destaca por sua participação em diversas reações nos organismos humano e vegetal. No organismo humano, as suas principais funções são devidas à sua capacidade antioxidante, participação na formação de tecido conjuntivo, hormônios, anticorpos e outros (BAUERNEFEIND, 1978; YAHIA *et al.*, 2001). A ingestão diária recomendada de AA é de 90 mg para os homens, 75 mg para as mulheres e 25 mg para as crianças. Fumantes e idosos requerem uma ingestão diária aumentada (50 e 150 mg /dia respectivamente) (SMIRNOFF *et al.*, 2001; WRIGHT; KADER, 1997).

Nos vegetais o ácido ascórbico é o antioxidante hidrossolúvel mais abundante, e suas funções fisiológicas são: antioxidante, co-fator enzimático e precursor da síntese de oxalato e tartarato, e também oferece proteção contra radicais livres formados durante a fotossíntese, fotoproteção e resistência ao estresse ambiental (AWAD, 1993; SMIRNOFF, 2000).

O ácido ascórbico pode ser encontrado sob a forma reduzida ou oxidada (ácido desidroascórbico – ADHA), em reação catalisada por enzimas, ou pela presença de metais, radicais livres ou oxigênio. A reação de oxidação do AA a ADHA é reversível e forma o radical ascorbila (RA) como composto intermediário (Figura 3). A formação deste radical é essencial para a atividade antioxidante do ácido ascórbico (BUETTNER; SCHAFER, 1997).

Em sistemas lipofílicos, o ácido ascórbico não é capaz de inibir a peroxidação lipídica. Estudos *in vitro* mostraram que o ácido ascórbico na presença de metais, como o ferro, pode gerar radicais livres e atuar como pró-oxidante (ODIN, 1997). Por este motivo, o papel do ácido ascórbico como antioxidante no organismo humano ainda é discutido e, conseqüentemente, sua ação protetora contra os radicais livres pela integridade celular (HERCBERG *et al.*, 1998).

Tanto o AA como o ADHA apresentam atividade vitamínica C, e seu mecanismo bioquímico de ação está ainda sendo estudado, entretanto, o sistema redox parece ser a base desta atividade fisiológica (MACHLIN, 1993).

FIGURA 3. Esquema da reação de oxidação do ácido ascórbico a ácido desidroascórbico, com a formação do radical ascorbila como composto intermediário (BUETTNER & SCHAFER, 1997).

A maioria dos radicais livres endógenos deriva do metabolismo do oxigênio molecular, utilizado na cadeia respiratória, que ocorre na membrana interna da mitocôndria para a produção de energia, na forma de ATP (trifosfato de adenosina). Entretanto, não é todo o oxigênio disponível na célula que se converte em energia, uma pequena parte dá origem a radicais livres. A produção de radicais livres é, portanto, uma consequência natural da existência dos seres aeróbios, que utilizam o oxigênio para queimar substratos ricos em carbono e hidrogênio, obtendo a energia química e térmica essenciais para a vida (GUTTERIDGE, 1995).

Por isto, existe um paradoxo, pois o oxigênio, assim como é indispensável para a vida, pode resultar em danos reversíveis ou até irreversíveis quando seres vivos são expostos a ele, uma vez que a ocorrência de espécies de oxigênio reativo (EOR) e nitrogênio reativo (ENR) é um atributo do processo normal do metabolismo aeróbio. Contudo, um desequilíbrio no sistema oxidativo da célula pode levar ao chamado “estresse oxidativo”, que é um distúrbio no estado de equilíbrio do sistema pró-oxidante/antioxidante, e que funciona continuamente para gerar e detoxificar oxidantes durante o metabolismo aeróbio normal (THOMAS, 1994).

Apesar de amplamente empregado, o termo radical livre não é o ideal, considerando que nem todos os agentes reativos apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. O termo genérico “espécies reativas de oxigênio” (ERO) e “espécies reativas de nitrogênio” (ERN) são os termos mais corretos (HALLIWELL *et al.*, 1993).

Os mecanismos antioxidantes podem ser enzimáticos (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase) e não enzimáticos (vitamina E, flavonóides, carotenóides, vitamina C). O termo antioxidante se refere a qualquer substância capaz de reduzir os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, aminoácidos e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (CHEESEMAN; SLATER, 1996; PIETTA, 2000).

Os efeitos deletérios do estresse oxidativo sobre os seres vivos podem variar consideravelmente conforme o tipo de organismo, seu estado fisiológico, suas defesas antioxidantes e sua dieta, assim como diferentes tecidos de um mesmo ser vivo reagem e são afetados diferentemente por estes efeitos (VOET *et al.*, 2000).

Considerando as propriedades biológicas dos flavonóides e da vitamina C, principalmente por sua participação no sistema antioxidante do organismo (SMITH *et al.*, 1994), é importante avaliar a estabilidade destes compostos durante o armazenamento de produtos que apresentam longa vida-de-prateleira, como as polpas de frutas congeladas.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito do armazenamento em condições comerciais (- 18 °C) de polpas de frutas (acerola, açaí, amora e morango) e o efeito do processamento artesanal para sua obtenção sobre os teores de flavonóides, vitamina C e sobre a atividade antioxidante *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos *in natura* de açaí, acerola, amora e morango c.v. Oso grande e as polpas comerciais (duas de cada fruto) foram adquiridos na CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns gerais de São Paulo).

A partir dos frutos *in natura* foram produzidas polpas no laboratório, através de uma simulação do processo artesanal que consistia em: lavagem em água corrente, seleção, trituração no liquidificador, despulpamento com o auxílio de uma peneira e congelamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, de acordo com informações obtidas junto à Embrapa e ao produtor “Sítio do Bello”.

As amostras de frutas foram cortadas em pedaços, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises. Antes das análises, as amostras foram homogeneizadas em gral com pistilo sob nitrogênio líquido.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, ou grau cromatográfico quando necessário. Os padrões de luteolina, apigenina, caempferol, quercetina, catequina, epicatequina, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido ascórbico, ácido linoléico, butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), β -caroteno, DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e monopalmitato de polioxietilenosorbitana (Tween 40) foram obtidos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA). As antocianidinas cianidina, pelargonidina e malvidina foram adquiridas da Extrasynthese (Genay, França).

Para purificação em fase sólida utilizou-se poliamida CC6 (Macherey-Nagel GmbH & Co., Alemanha).

3.1. Determinação de umidade

A determinação de umidade foi realizada pesando-se cerca de 2 g (gramas) de amostra em cadinhos de alumínio com tampa, e colocados em estufa a vácuo a 70 °C até peso constante, sob pressão ≤ 100 mm Hg (AOAC, 1995). As determinações foram realizadas em triplicata.

3.2. Determinação de flavonóides

3.2.1. Extração

A extração, em duplicata, foi realizada homogeneizando-se cerca de 10 g de amostra em 100 mL de metanol/água/ácido acético na proporção de 70:30:5 (incluindo a água das amostras), utilizando-se Ultra-Turrax (Polytron®-Kinematica GnbH, Kriens-Luzern), por 1 minuto em velocidade 5, em banho de gelo. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. O resíduo foi re-extraído mais 2 vezes com 50 mL da mesma solução. Os extratos foram concentrados em Rotavapor (RE 120 – Büchi, Flavil, Suíça), em banho a 40°C, até eliminação do metanol (volume final ~20 mL).

3.2.2. Extração em fase sólida

O volume dos extratos obtidos acima foi ajustado com água deionizada para 50 mL em balão volumétrico e uma alíquota de 10 mL foi passada em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel & Co., Alemanha), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology, Hertforshire, Reino Unido). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água deionizada. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 20 mL de água e a eluição dos flavonóides foi realizada com 50 mL de metanol seguidos por 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5), utilizando-se manifold Visiprep 24 DL da Supelco (Bellefonte, E.U.A.).

Após secagem completa dos eluatos através de rotaevaporação, os resíduos foram ressuspensos em 1 mL de metanol, ou 1 mL de metanol/ácido acético (95:5) para as frações que continham antocianinas, e filtrados utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, E.U.A.) de 0,22 µm de poro.

3.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O cromatógrafo utilizado foi o do sistema Hewlett-Packard 1100, constituído por injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector de arranjo de iodos (DAD), monitorado pelo software ChemStation.

A coluna utilizada foi a Prodigy 5 µ ODS 250 x 4,60 mm (Phenomenex Ltda, Reino Unido). As fases móveis utilizadas foram, A: água/tetrahidrofurano/ácido trifluoroacético (98:2:0,1) e B: acetonitrila, na proporção de 17% de B durante dois min, aumentando para 25% de B após cinco min, 35% de B após mais oito min e

50% de B após mais cinco min, e para a limpeza da coluna a fase B foi aumentada para 90 % , de acordo com o método de Price *et al.* (1999).

As amostras foram injetadas em duplicata, variando-se entre 5 e 20 μ L, de acordo com a concentração da amostra. A determinação foi realizada comparando-se os tempos de retenção e os espectros obtidos com os dos padrões que foram previamente usados na calibração. Considerou-se uma identificação positiva quando a semelhança entre os espectros foi igual ou superior a 99 %.

A calibração foi realizada através da injeção dos padrões em triplicata em cinco concentrações diferentes, de 0,5 a 10 μ g.

Os resultados foram expressos em mg de aglicona/100 g de amostra, em base úmida (b.u.).

3.3. Determinação de fenólicos totais

As amostras pulverizadas foram extraídas na proporção amostra:solvente 1:20 (m/v), com metanol:ácido acético 95:5 (v/v), usando-se Ultra-Turrax (Polytron® - Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça), por 1 minuto em velocidade 5, em banho de gelo. O resíduo foi re-extraído na mesma proporção. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e o volume completado para 50 mL.

A determinação foi feita de acordo com Zieliński e Kozolwska (2000), com algumas modificações (GENOVESE *et al*, 2003): 0,25 mL dos extratos obtidos acima, ou da diluição adequada dos mesmos, foram adicionados a 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 min à temperatura ambiente, adicionaram-se 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio, e os tubos foram colocados em banho a 37°C durante 30 min. As absorbâncias foram

determinadas a 750 nm e os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina por 100 g de amostra (b.u.).

3.4. Atividade antioxidante

Os extratos obtidos no item anterior (3.3) foram utilizados para analisar a atividade antioxidante através de dois métodos diferentes, descritos a seguir.

3.4.1. Sistema β -caroteno/ácido linoléico

Este método foi originalmente descrito por Marco (1968) e posteriormente modificado por Miller (1971). Para o preparo de mistura reativa adicionaram-se 20 mg de ácido linoléico, 200 mg de Tween 40, 25 μ L de uma solução de β -caroteno (2 mg/mL clorofórmio) e 500 μ L de clorofórmio em erlenmeyer. Após a secagem completa do clorofórmio sob nitrogênio, adicionaram-se 25 mL de água previamente saturada com oxigênio durante 30 minutos e agitou-se vigorosamente. A mistura reativa assim preparada deve estar límpida e apresentar absorvância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm.

A análise foi realizada utilizando-se uma microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 250 μ L desta mistura reativa, 10 μ L de metanol para o grupo controle, ou o mesmo volume para as soluções-padrão em metanol e os extratos obtidos no item 3.3. As leituras das absorvâncias foram realizadas, no início e com intervalos de 15 minutos durante 180 minutos a 45°C, em espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

A porcentagem de inibição da oxidação foi calculada através do decaimento da absorbância a 470 nm do controle (A_c), que deve ficar abaixo de 0,2 para ser considerado 100% da oxidação, após 180 minutos de reação. A queda da absorbância das amostras (A_{am}) foi correlacionada com a queda do controle e estabeleceu-se a porcentagem de inibição (%I) da oxidação através da seguinte fórmula:

$$A_c = Abs_{inicial} - Abs_{final}$$

$$A_{am} = Abs_{inicial} - Abs_{final}$$

$$\%I = \frac{A_c - A_{am}}{A_c} \times 100$$

3.4.2. Seqüestro de radicais livres

A atividade antioxidante foi determinada através do seqüestro do radical estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pela ação dos antioxidantes presentes na amostra (BRAND-WILLIAMS, 1995). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH (~20 mg/mL) de forma a apresentar absorbância em 517 nm entre 0,6 e 0,7.

As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambrigde, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 250 µL da solução de DPPH, 40 µL de metanol para o grupo controle, ou o mesmo volume para as soluções-padrão em metanol ou os extratos obtidos no item 3.3, adequadamente diluídos. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 25 minutos de reação

em espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a 25 °C. A curva de calibração foi preparada com uma solução de butilhidroxitolueno (BHT), e os resultados foram expressos em μ moles equivalentes de BHT/g amostra (b.u.).

3.5. Determinação de vitamina C

Para as análises de ácido ascórbico (AA) e desidroascórbico (ADHA), as amostras previamente pulverizadas foram homogeneizadas com solução de ácido acético a 0,1%, em proporção 1:10 (m/v). Todo o procedimento foi realizado entre 0 e 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore® (Bedford, E.U.A.) de 0,45 μ m, e o volume ajustado com ácido acético 0,1 % para balão de 10 ou 25 mL de acordo com a amostra. O filtrado foi diluído 1:1 com ácido acético para a análise do AA e com ditioneitol (DTT) 0,5 M em tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 7) para análise da vitamina C total. O conteúdo de ADHA foi obtido pela diferença entre o conteúdo de vitamina C total e de AA. As análises foram realizadas por CLAE utilizando uma coluna Nucleosil 100 C₁₈, 125 x 4mm, porosidade 5 μ m, e a fase móvel composta por: A: ácido acético 0,1% em água e B: ácido acético 0,1 % em acetonitrila, em proporção 20:80 v/v (A:B) com fluxo de 1 mL/min. A curva padrão foi preparada com padrões de ácido ascórbico em concentrações entre 10 e 100 μ g/mL. A detecção foi realizada a 254 nm.

3.6. Análise dos resultados

Os resultados foram analisados através da comparação das médias e desvios-padrões utilizando-se o programa Statistica versão 5.0 (StatSoft, Tulsa, E.U.A.). A comparação das médias foi realizada por análise de variância ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De cada fruto selecionado (morango, açaí, amora e acerola) foram analisadas três polpas congeladas, sendo duas comerciais e uma produzida em laboratório, de acordo com o procedimento artesanal. No caso do açaí, devido à impossibilidade da reprodução de condições adequadas, não foi preparada a polpa no laboratório.

As polpas congeladas comerciais e as produzidas no laboratório foram armazenadas durante 1 ano em condições comerciais (- 18 °C), sendo este o prazo de validade máximo para as polpas de frutas congeladas, de acordo com os fabricantes. Os frutos não foram submetidos ao armazenamento.

4.1. Teores de umidade dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas

Os teores de umidade nas frutas afetam o rendimento na elaboração de produtos concentrados e/ou desidratados, como as polpas de frutas congeladas. Os frutos com as maiores relações entre polpa/casca e com uma reduzida massa da casca, como o morango, conseqüentemente apresentam um maior rendimento de polpa. O rendimento de polpa é um parâmetro de qualidade importante para as indústrias, já que as frutas que possuem um alto rendimento de polpa representam alta lucratividade para as indústrias (CHITARRA; CHITARRA, 1990).

No caso das polpas produzidas em nosso laboratório, o maior rendimento foi obtido para o morango, de 90 %, resultado condizente com o maior teor de umidade deste fruto (Tabela 1). Para as polpas de acerola e amora-preta foram obtidos rendimentos de 85 e 84 %, respectivamente.

Como mostra a Tabela 1, as polpas congeladas apresentaram teores de umidade superiores aos seus respectivos frutos, conseqüência da separação das sementes e/ou fibras durante o processo de despulpamento. Já as polpas

congeladas de açaí apresentaram teores muito superiores ao do seu respectivo fruto, devido à adição de água permitida neste caso, para facilitar o processo de despolpamento, uma vez que o fruto possui um teor de umidade baixíssimo. A polpa de amora comercial "A" apresentou um conteúdo muito elevado de água (96 %), indicando que talvez tenha sofrido adição da mesma.

Tabela 1. Teores de umidade dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas.

Amostras	% Umidade
Acerola (<i>Malpighia sp.</i>)	
Fruto <i>in natura</i>	88,7 ± 0,3
Polpa de Laboratório	92,6 ± 0,2
Polpa Comercial (A)	91,3 ± 0,4
Polpa Comercial (B)	92,0 ± 0,3
Morango (<i>Fragaria x ananassa</i>)	
Fruto <i>in natura</i>	91,1 ± 0,1
Polpa de Laboratório	92,2 ± 0,3
Polpa Comercial (A)	91,7 ± 0,3
Polpa Comercial (B)	92,8 ± 0,4
Amora-preta (<i>Rubus ssp.</i>)	
Fruto <i>in natura</i>	85,5 ± 0,3
Polpa de Laboratório	87,1 ± 0,1
Polpa Comercial (A)	96,0 ± 0,2
Polpa Comercial (B)	92,3 ± 0,3
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)	
Fruto <i>in natura</i>	47,0 ± 0,2
Polpa Comercial (A)	88,5 ± 0,1
Polpa Comercial (B)	91,2 ± 0,3

Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3)

4.2. Teores de vitamina C dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas.

A Tabela 2 mostra o teor de ácido ascórbico (AA), ácido desidroascórbico (ADHA) e vitamina C total (AA + ADHA) dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas antes e após um ano de armazenamento em temperatura comercial (-18°C).

Não foi detectada vitamina C nas amostras de açaí, e as amostras de amora-preta apresentaram os menores teores. Como trata-se de dois frutos ricos em antocianinas, Cordenunsi *et al.* (2002) sugeriram haver uma relação proporcionalmente inversa entre os teores de cianidina/ácido ascórbico.

A acerola *in natura* apresentou uma concentração de vitamina C total 27 % menor do que a sua respectiva polpa congelada produzida no laboratório. Esta diferença pode ter ocorrido pela concentração destes compostos durante o processo de despulpamento, devido principalmente à retirada das sementes. A polpa comercial da marca “A” apresentou a maior concentração de vitamina C total, valor muito superior ao encontrado no fruto analisado. Esta diferença pode ser devida à utilização de diferentes variedades e/ou condições de cultivo, tipo de solo, temperatura e outros (SINGH *et al.*, 1996).

O produto imediato da oxidação do ácido ascórbico é o ácido desidroascórbico (ADHA), formado pela ação das enzimas ascorbato oxidase e ascorbato peroxidase ou pela presença de metais. O ácido ascórbico quando participa do sistema antioxidante protegendo o vegetal de eventuais danos oxidativos, também gera o ácido desidroascórbico (DEUTSCH, 2000).

O ADHA encontrado nas polpas de frutas congeladas pode ser proveniente da oxidação natural ocorrida no fruto ou formado a partir da oxidação do ácido

ascórbico durante o processo de despulpamento, principalmente pelo rompimento da matriz e consequente exposição do ácido ascórbico ao oxigênio (MOKADY *et al.*, 1984).

De acordo com a Tabela 2, podemos verificar que não ocorreu oxidação do ácido ascórbico durante o processo artesanal ou industrial de despulpamento para a obtenção das polpas congeladas de acerola, uma vez que não foi detectado ADHA na polpa comercial “A”, e uma concentração muito baixa nas polpas congeladas de laboratório e comercial “B”.

Segundo Cordenunsi *et al.* (2005) o conteúdo de vitamina C total do morango em cultivares brasileiros encontra-se entre 47 – 80 mg/100 g amostra (b.u.), resultado semelhante ao morango c.v. Oso grande *in natura* analisado neste trabalho. Não foi detectado ácido ascórbico reduzido nas polpas comerciais de morango, mas sim a sua forma oxidada (ADHA) em concentrações razoáveis. O morango apresentou uma concentração de ácido ascórbico 91 % maior do que sua respectiva polpa produzida no laboratório, e uma concentração muito inferior de ADHA (Tabela 2). Este resultado é um indício da ocorrência da oxidação do ácido ascórbico durante a produção industrial das polpas congeladas de morango, diferentemente do que ocorre na produção das polpas congeladas de acerola.

Não foi detectado AA nas polpas comerciais de amora. Apenas o ácido desidroascórbico foi detectado em baixa concentração no fruto e na sua respectiva polpa congelada produzida no laboratório. Observou-se também uma leve diminuição do teor de ácido desidroascórbico da polpa em relação ao seu fruto de origem (Tabela 2), podendo ter ocorrido degradação do ADHA durante o processo de despulpamento.

De acordo com a Tabela 2, podemos observar que não ocorreram alterações significativas nos teores de ácido ascórbico e ácido desidroascórbico decorrentes do armazenamento das polpas de frutas congeladas por períodos de até um ano em temperatura comercial (- 18 °C).

Yamashita *et al.* (2003) também detectaram a estabilidade da vitamina C em polpas de frutas congeladas armazenadas nas mesmas condições, por quatro meses. Mas em contrapartida, o mesmo não ocorreu para o suco pasteurizado e acondicionado em garrafa de vidro, uma vez que o suco apresentou uma perda de 32 % da vitamina C após 4 meses de armazenamento em temperatura ambiente.

Yamashita *et al.* (2003) sugeriram que a estabilidade da vitamina C em produtos de acerola é dependente tanto do tipo de processamento quanto da temperatura de armazenamento. Os produtos que utilizam o congelamento como forma de conservação, como as polpas de frutas congeladas, apresentam maior eficiência na retenção do teor de vitamina C em relação aos produtos pasteurizados e acondicionados em temperatura ambiente.

Tabela 2. Teores de vitamina C dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).

Amostras	mg/100 g (b.u.)							
	Ácido ascórbico*				Ácido desidroascórbico*			
	Controle	6 meses	1 ano	Controle	6 meses	1 ano	Controle	Vitamina C total*
Acerola (<i>Malpighia</i> sp.)								
Fruto <i>in natura</i>	790 ± 10 ^a	n.a.	n.a.	297 ± 8 ^a	n.a.	n.a.	1086 ± 20 ^a	n.a.
Polpa de Laboratório	1262 ± 26 ^b	1272 ± 31 ^b	1278 ± 28 ^b	241 ± 7 ^b	242 ± 7 ^b	246 ± 9 ^b	1503 ± 31 ^b	1525 ± 26 ^b
Polpa Comercial (A)	2364 ± 41 ^c	2334 ± 36 ^c	2288 ± 37 ^c	n.d.	n.d.	n.d.	2358 ± 36 ^c	2338 ± 27 ^c
Polpa Comercial (B)	1818 ± 27 ^d	1815 ± 25 ^d	1764 ± 31 ^d	63 ± 2 ^c	63 ± 2 ^c	63 ± 4 ^c	1885 ± 23 ^d	1828 ± 31 ^d
Morango (<i>Fragaria x ananassa</i>)								
Fruto <i>in natura</i>	69 ± 3 ^e	n.a.	n.a.	18 ± 1 ^d	n.a.	n.a.	88 ± 1 ^a	n.a.
Polpa de Laboratório	36 ± 2 ^f	38 ± 2 ^f	35 ± 2 ^f	40 ± 2 ^e	36 ± 2 ^e	36 ± 2 ^e	76 ± 3 ^b	71 ± 3 ^b
Polpa Comercial (A)	n.d.	n.d.	n.d.	47 ± 2 ^f	50 ± 2 ^f	47 ± 1 ^f	47 ± 2 ^c	47 ± 1 ^c
Polpa Comercial (B)	n.d.	n.d.	n.d.	40 ± 1 ^e	38 ± 2 ^e	39 ± 2 ^e	40 ± 1 ^d	39 ± 2 ^d
Amora-preta (<i>Rubus</i> sp.)								
Fruto <i>in natura</i>	n.d.	n.a.	n.a.	34 ± 2 ^e	n.a.	n.a.	34 ± 2 ^e	n.a.
Polpa de Laboratório	n.d.	n.d.	n.d.	25 ± 1 ^g	24 ± 1 ^g	26 ± 1 ^g	25 ± 1 ^f	26 ± 1 ^f
Polpa Comercial (A)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Polpa Comercial (B)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). O controle corresponde às amostras antes do armazenamento. Médias no mesmo grupo* com letras iguais não diferem significativamente (p<0,05).

n.a. não analisado; n.d. não detectado; b.u. base úmida

4.3. Teores de flavonóides dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas.

Os teores de flavonóides da acerola (Tabela 3), morango (Tabela 4), açaí (Tabela 5) e amora (Tabela 6) mostram a predominância das antocianinas em todos os frutos, sendo o conteúdo da amora de 3 a 5 vezes maior que o dos outros. Os glicosídeos de cianidina foram detectados em todas as amostras analisadas, e os de pelargonidina nas amostras de acerola e morango.

De acordo com a Tabela 3, podemos verificar que o teor de antocianinas (soma dos derivados de cianidina e pelargonidina) encontrado na acerola foi 84 % superior ao encontrado na sua respectiva polpa congelada produzida no laboratório, e cinco vezes maior em relação às 2 polpas comerciais. Esta diferença ocorre porque durante o processo de despulpamento há separação do epicarpo, região onde predominam as antocianinas responsáveis pela coloração vermelha do fruto (VENDRAMINI; TRUGO, 2004). O diâmetro menor das peneiras das despulpadeiras utilizadas pelas indústrias em relação ao diâmetro da peneira utilizado no processamento artesanal também pode ter influenciado na menor concentração de antocianinas encontrada nas polpas comerciais, uma vez que as polpas congeladas não podem ultrapassar o total de partículas sólidas permitida pela legislação vigente (BRASIL, 2000). Apesar da diferença de concentração dos compostos, os perfis cromatográficos obtidos por CLAE para o fruto e as polpas foram similares (vide anexo: Figura A 1 e 2). Também foram detectados glicosídeos de quercetina e caempferol em amostras de acerola em concentrações semelhantes às encontradas por Lima *et al.* (2000).

Pode-se observar também (Tabela 3) que não ocorreram alterações significativas nos teores de flavonóides durante 1 ano de armazenamento em

temperatura comercial (-18 °C). Esta afirmação é corroborada por Mullen *et al.* (2002) que analisaram compostos fenólicos e vitamina C de framboesa, e verificaram que não houve alteração na concentração destas substâncias durante o armazenamento a 4 °C por 3 dias e, conseqüentemente manutenção da atividade antioxidante.

Tabela 3. Teores de flavonóides (mg aglicona/ 100 g amostra (b.u.)) da acerola (*Malpighia sp.*) e de suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).

Amostras	mg/100 g amostra (b.u.)		
	Cianidina	Pelargonidina	Quercetina
Controle			
Fruto <i>in natura</i>	38 ± 2 ^a	9,1 ± 0,5 ^a	1,26 ± 0,4 ^a
Polpa de Laboratório	22 ± 1 ^b	3,4 ± 0,3 ^b	1,27 ± 0,3 ^a
Polpa Comercial (A)	7,6 ± 0,2 ^c	1,32 ± 0,05 ^c	2,10 ± 0,5 ^b
Polpa Comercial (B)	13 ± 1 ^d	1,01 ± 0,03 ^d	5,5 ± 0,2 ^c
6 meses			
Polpa de Laboratório	20 ± 1 ^b	2,8 ± 0,2 ^b	1,21 ± 0,5 ^a
Polpa Comercial (A)	7,3 ± 0,2 ^c	1,21 ± 0,05 ^e	1,9 ± 0,1 ^b
Polpa Comercial (B)	12,2 ± 0,4 ^d	0,94 ± 0,03 ^d	5,3 ± 0,1 ^c
1 ano			
Polpa de Laboratório	23 ± 1 ^b	3,0 ± 0,2 ^b	1,26 ± 0,4 ^a
Polpa Comercial (A)	7,7 ± 0,3 ^c	1,25 ± 0,04 ^{ce}	1,8 ± 0,2 ^b
Polpa Comercial (B)	12,8 ± 0,4 ^d	0,98 ± 0,02 ^d	5,8 ± 0,3 ^c

Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). O controle corresponde às amostras antes do armazenamento. Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (p<0,05).
b.u. base úmida

Como mostra a Tabela 4, a pelargonidina foi o flavonóide predominante nas amostras analisadas de morango, similar ao encontrado por Cordenunsi *et al.* (2005). As amostras de morango (fruto e polpas congeladas) analisadas apresentaram perfil cromatográfico semelhante (vide anexo: Figura A 3; 4 e 5).

O teor de antocianinas (soma dos glicosídeos de pelargonidina e cianidina) detectado no morango *in natura* foi semelhante ao encontrado na sua respectiva polpa congelada produzida no laboratório, mostrando não haver concentração e nem perda destes compostos durante o processo de despulpamento, consequência de uma maior relação entre polpa/casca no caso deste fruto, diferentemente do ocorrido com a polpa de laboratório da acerola (Tabela 3).

A polpa congelada comercial “B” apresentou teores muito baixos de flavonóides, aproximadamente 90 % a menos em relação aos teores detectados no morango *in natura*, o que pode ser decorrente de um teor reduzido na matéria-prima e/ou perdas durante o processamento.

No morango também foram encontrados os glicosídeos de quercetina e caempferol, além da forma livre do ácido elágico.

Similar ao observado para a vitamina C, também não ocorreram alterações significativas nos teores de flavonóides durante 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).

Tabela 4. Teores de flavonóides (mg aglicona/ 100 g amostra (b.u.)) e ácido elágico livre do morango (*Fragaria x ananassa*) e de suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).

Amostras	mg/100 g amostra (b.u.)			
	Pelargonidina	Cianidina	Quercetina	Caempferol
Controle				
Fruto <i>in natura</i>	30 ± 1 ^a	1,43 ± 0,05 ^a	2,5 ± 0,1 ^a	0,77 ± 0,03 ^a
Polpa de Laboratório	29 ± 1 ^a	1,38 ± 0,05 ^a	2,0 ± 0,1 ^b	0,54 ± 0,03 ^b
Polpa Comercial (A)	23 ± 1 ^b	0,28 ± 0,03 ^b	1,74 ± 0,05 ^c	0,56 ± 0,03 ^b
Polpa Comercial (B)	3,1 ± 0,2 ^c	0,18 ± 0,01 ^c	1,70 ± 0,05 ^c	0,33 ± 0,02 ^c
6 meses				
Polpa de Laboratório	30 ± 1 ^a	1,41 ± 0,06 ^a	2,0 ± 0,1 ^b	0,53 ± 0,03 ^b
Polpa Comercial (A)	22 ± 1 ^b	0,32 ± 0,03 ^b	1,52 ± 0,5 ^d	0,50 ± 0,03 ^b
Polpa Comercial (B)	3,1 ± 0,2 ^c	0,15 ± 0,01 ^c	1,8 ± 0,1 ^c	0,36 ± 0,02 ^c
1 ano				
Polpa de Laboratório	29 ± 1 ^a	136 ± 0,05 ^a	1,8 ± 0,1 ^b	0,55 ± 0,02 ^b
Polpa Comercial (A)	23 ± 1 ^b	0,30 ± 0,03 ^b	1,54 ± 0,4 ^d	0,52 ± 0,03 ^b
Polpa Comercial (B)	3,3 ± 0,1 ^c	0,18 ± 0,01 ^c	1,74 ± 0,04 ^c	0,33 ± 0,03 ^c

Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). O controle corresponde às amostras antes do armazenamento. Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (p<0,05).
n.d. não detectado; b.u. base úmida

O mesocarpo é a parte comestível do fruto utilizada para obtenção de um líquido espesso conhecido como "vinho de açaí", através da maceração do mesocarpo com água morna e posterior peneiramento. Este "vinho de açaí" é congelado e vendido comercialmente com a denominação "polpa de fruta" congelada (AGUIAR *et al.*, 1980).

De acordo com a Tabela 5, podemos verificar que o açaí não possui uma gama muito ampla de flavonóides, uma vez que foram detectados apenas os glicosídeos de cianidina (antocianina) e a luteolina glicosilada (flavona). O teor de cianidina encontrado na polpa comercial "A" foi quase o dobro em relação ao encontrado no fruto. Esta diferença pode ter ocorrido pela concentração desta substância durante o processo de despulpamento para a obtenção da polpa congelada ou "vinho", devido à separação das fibras presentes no fruto. Porém, a polpa comercial "B" apresentou a mesma concentração do fruto, indicativo de que o processo para elaboração da polpa comercial "A" foi mais eficiente ou que a matéria-prima possuía um teor maior destes compostos

Como o açaí trata-se de um fruto que vem despertando o interesse dos pesquisadores apenas recentemente, não se encontram muitos dados sobre sua composição. Pozo-Insfran *et al.* (2004) detectaram um teor de 104 mg de cianidina/100 mL de polpa de açaí.

Pode-se observar também que não ocorreram alterações significativas dos teores de flavonóides durante 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).

Tabela 5. Teores de flavonóides (mg aglicona/ 100 g amostra (b.u.)) do açaí (*Euterpe oleracea*) e de suas respectivas polpas congeladas antes e após 6 meses de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).

Amostras	mg/100 g amostra (b.u.)	
	Cianidina	Luteolina
Controle		
Fruto <i>in natura</i>	55 ± 3 ^a	10,0 ± 0,4 ^a
Polpa Comercial (A)	98 ± 3 ^b	0,88 ± 0,04 ^b
Polpa Comercial (B)	50 ± 2 ^a	4,0 ± 0,3 ^c
6 meses		
Polpa Comercial (A)	93 ± 3 ^b	0,84 ± 0,03 ^b
Polpa Comercial (B)	51 ± 2 ^a	4,5 ± 0,3 ^c
1 ano		
Polpa Comercial (A)	96 ± 2 ^b	0,90 ± 0,04 ^b
Polpa Comercial (B)	48 ± 1 ^a	4,2 ± 0,2 ^c

Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). O controle corresponde às amostras antes do armazenamento. Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (p<0,05).

b.u. base úmida

A cianidina foi o flavonóide predominante entre as amostras de amora-preta analisadas, representando 75 % dos flavonóides encontrados neste fruto, sendo confirmado por Deighton *et al.* (2000) que também detectaram a cianidina como flavonóide predominante, mas em proporção menor.

De acordo com a Tabela 6, podemos verificar que entre todas as amostras analisadas, a amora-preta *in natura* apresentou o maior teor de flavonóides. A amora também apresentou a maior variedade de flavonóides, sendo detectados derivados glicosilados da cianidina, os flavonóis derivados da quercetina e caempferol, os flavanóis catequina e epicatequina, além dos derivados do ácido elágico. Os teores de flavonóides detectados na amora e sua respectiva polpa congelada produzida no laboratório foram semelhantes, isto ocorreu porque a amora possui sementes pequenas (POLING, 1996), consequentemente não ocorrendo concentração nem perdas durante o processo de despulpamento. A polpa comercial de amora “B” apresentou teores de flavonóides muito baixos em relação ao fruto, e esta diminuição pode ter ocorrido pela alta quantidade de água presente nesta amostra (Tabela 1), podendo ser decorrente da adição de água ao produto durante o processo industrial.

Também pode-se observar que ocorreu uma pequena diminuição nos teores dos derivados de quercetina durante 1 ano de armazenamento, apenas na polpa comercial “A”, mas em compensação não ocorreram alterações significativas dos teores de flavonóides nas outras amostras analisadas durante o mesmo período de armazenamento.

Tabela 6. Teores de flavonóides (mg aglicona/ 100 g amostra (b.u.)) e ácido elágico livre da amora (*Rubus ssp.*) e de suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).

Amostras	mg/100 g amostra (b.u.)				
	Cianidina	Quercetina	Caempferol	Epicatequina	Catequina
Controle					
Fruto <i>in natura</i>	175 ± 11 ^a	10,2 ± 0,2 ^a	0,45 ± 0,03 ^a	45 ± 1 ^a	2,8 ± 0,2 ^a
Polpa de Laboratório	180 ± 8 ^a	11,3 ± 0,3 ^b	0,51 ± 0,02 ^b	45 ± 1 ^a	4,3 ± 0,3 ^b
Polpa Comercial (A)	80 ± 3 ^c	9,8 ± 0,2 ^c	0,36 ± 0,03 ^c	14,6 ± 0,5 ^b	4,0 ± 0,2 ^b
Polpa Comercial (B)	81 ± 3 ^c	6,8 ± 0,2 ^d	0,40 ± 0,03 ^c	n.d.	n.d.
6 meses					
Polpa de Laboratório	163 ± 6 ^d	10,8 ± 0,4 ^b	0,55 ± 0,03 ^b	45 ± 1 ^a	3,8 ± 3 ^b
Polpa Comercial (A)	71 ± 3 ^e	9,0 ± 0,2 ^e	0,31 ± 0,03 ^c	15,6 ± 0,4 ^b	3,6 ± 0,3 ^b
Polpa Comercial (B)	76 ± 2 ^c	5,6 ± 0,1 ^f	0,33 ± 0,03 ^c	n.d.	n.d.
1 ano					
Polpa de Laboratório	165 ± 4 ^d	11,0 ± 0,3 ^b	0,53 ± 0,02 ^b	43 ± 2 ^a	4,0 ± 2 ^b
Polpa Comercial (A)	75 ± 2 ^e	9,2 ± 0,2 ^e	0,35 ± 0,03 ^c	15,2 ± 0,3 ^b	3,8 ± 0,2 ^b
Polpa Comercial (B)	78 ± 2 ^c	5,7 ± 0,2 ^f	0,36 ± 0,03 ^c	n.d.	n.d.

Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). O controle corresponde às amostras antes do armazenamento. Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (p<0,05).

n.d. não detectado; b.u. base úmida

4.4. Teores de fenólicos totais dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas

O teor de fenólicos totais foi determinado com o uso do reagente Folin-Ciocalteu. Este reagente consiste do ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico, que reage com hidroxilas redutoras. Ao oxidar os compostos fenólicos, o reagente de Folin-Ciocalteu se reduz formando o complexo azul de molibdênio (NIELSEN, 1998). Apesar da sua ampla aceitação, este método é passível de interferentes como o ácido ascórbico, que possui duas hidroxilas redutoras, e portanto, leva a uma superestimação dos resultados (GENOVESE *et al.*, 2003). Esta capacidade do ácido ascórbico em reduzir o reagente Folin-Ciocalteu pode ser observada na Figura 5, na qual se observa uma resposta linear do ácido ascórbico em quantidades de até 50 μg ($R^2 = 0,993$).

Figura 4. Resposta do ácido ascórbico ao método Folin-Ciocalteu

Alguns trabalhos já tentaram minimizar ou subtrair o conteúdo de ácido ascórbico interferente, mas não obtiveram resultados satisfatórios, como Singleton *et al.* (1999) que propuseram determinar o teor de ácido ascórbico realizando as leituras das absorbâncias primeiro em pH ácido, antes da adição de álcali. Embora tenha sido de fato verificada uma resposta linear do ácido ascórbico nessas condições, observou-se que o mesmo ocorria para alguns compostos fenólicos, o que inviabilizou esta tentativa (GENOVESE *et al.*, 2003).

A Tabela 7 mostra o teor de compostos fenólicos antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18°C), e permite observar que os teores de compostos fenólicos foram muito superiores aos de flavonóides. No caso da acerola *in natura*, o teor de flavonóides (Tabela 3) correspondeu a apenas 8 % do teor de fenólicos totais (Tabela 7), resultado provavelmente decorrente da alta concentração de ácido ascórbico nesta amostra, que, conforme discutido, interfere na determinação dos fenólicos totais (Tabela 2).

As amostras de acerola apresentaram as maiores concentrações de fenólicos totais, resultado decorrente da elevada concentração de ácido ascórbico presente (Tabela 2). Resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que a presença de uma concentração superior a 5 µg de ácido ascórbico no meio de reação contribui de forma significativa na formação de cor, sendo que esta concentração só foi atingida nas análises das amostras de acerola.

O teor de flavonóides do açaí *in natura* (Tabela 5) foi 85 % menor do que os teores de fenólicos totais (Tabela 7), o que poderia ser explicado pelo alto teor de ácidos fenólicos (ácido elágico, gálico e *p*-cumárico) presente na amostra (POZO-INSFRAN *et al.*, 2004). Já para o morango e amora *in natura* os teores de flavonóides corresponderam a 20 e 56 % respectivamente dos teores de fenólicos

totais, provavelmente devido aos elagitaninos que correspondem a cerca de 60 % dos compostos fenólicos do morango e amora (TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000).

Os teores de fenólicos totais encontrados na amora *in natura* e na sua respectiva polpa congelada de laboratório foram bem superiores aos detectados nas polpas comerciais (Tabela 7), resultado similar ao encontrado para os teores de flavonóides (Tabela 6).

O teor elevado de fenólicos totais encontrado nas amostras de açaí foi quase que exclusivamente devido à alta concentração de cianidina nestas amostras, com a polpa comercial da marca “A” possuindo a maior concentração de fenólicos totais e a polpa comercial “B” a menor (Tabela 7).

Todas as amostras de morango analisadas apresentaram teores próximos de fenólicos totais, mesmo possuindo teores diferentes de flavonóides (Tabela 4). Este resultado pode ter ocorrido pela diferença na concentração de elagitaninos entre as amostras (TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000).

Assim como observado para a vitamina C e os flavonóides não ocorreram alterações significativas destes compostos durante o 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (- 18 °C).

Tabela 7. Teores de fenólicos totais dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).

Amostras	mg/100 g amostra (b.u.)		
	Controle	6 meses	1 ano
Acerola (<i>Malpighia sp.</i>)			
Fruto <i>in natura</i>	658 ± 20 ^a	n.a.	n.a.
Polpa de Laboratório	830 ± 22 ^b	790 ± 19 ^b	810 ± 15 ^b
Polpa Comercial (A)	1430 ± 22 ^c	1470 ± 23 ^c	1476 ± 25 ^c
Polpa Comercial (B)	972 ± 15 ^d	983 ± 12 ^d	940 ± 16 ^d
Morango (<i>Fragaria x ananassa</i>)			
Fruto <i>in natura</i>	191 ± 7 ^e	n.a.	n.a.
Polpa de Laboratório	182 ± 4 ^e	187 ± 3 ^e	190 ± 5 ^e
Polpa Comercial (A)	185 ± 5 ^e	190 ± 3 ^e	180 ± 4 ^e
Polpa Comercial (B)	130 ± 7 ^f	127 ± 4 ^f	125 ± 5 ^f
Amora-preta (<i>Rubus sp.</i>)			
Fruto <i>in natura</i>	420 ± 10 ^g	n.a.	n.a.
Polpa de Laboratório	420 ± 11 ^g	400 ± 13 ^g	411 ± 14 ^g
Polpa Comercial (A)	107 ± 2 ^h	105 ± 3 ^h	99 ± 3 ^h
Polpa Comercial (B)	194 ± 7 ^e	185 ± 5 ^e	200 ± 6 ^e
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)			
Fruto <i>in natura</i>	432 ± 12 ^g	n.a.	n.a.
Polpa Comercial (A)	500 ± 10 ⁱ	483 ± 8 ⁱ	505 ± 11 ⁱ
Polpa Comercial (B)	251 ± 9 ^j	236 ± 8 ^j	241 ± 7 ^j

Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). O controle corresponde às amostras antes do armazenamento. Médias com letras iguais não diferem significativamente (p<0,05).
n.a. não analisado; b.u. base úmida

4.5. Atividade antioxidante dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas

A atividade antioxidante foi determinada por dois métodos neste trabalho, pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico e pelo seqüestro dos radicais DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). O sistema β -caroteno/ácido linoléico avalia a capacidade do antioxidante em inibir o descoramento do β -caroteno causado pelos radicais livres formados durante a peroxidação do ácido linoléico (YANISHILIEVA; MARINOVA, 1995). O método do DPPH determina a capacidade do antioxidante seqüestrar radicais livres (BRAND-WILLIAMS, 1995).

4.5.1. Sistema β -caroteno/ácido linoléico

A Tabela 8 mostra a capacidade antioxidante determinada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico para os frutos e suas respectivas polpas congeladas, antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (- 18°C).

Todas as amostras de acerola apresentaram atividade pró-oxidante (representada pela porcentagem de inibição negativa), resultado devido ao alto teor de ácido ascórbico presente nessas amostras (Tabela 3). Como podemos observar na Figura 5, apesar da capacidade antioxidante conhecida do ácido ascórbico, neste sistema ele possui atividade pró-oxidante, proporcional a sua concentração. Isto ocorre porque o ácido ascórbico após doar os dois hidrogênios redutores, fica passível de receber elétrons, porque origina o radical ascorbila, que é um agente oxidante (BORS; BUETTNER, 1997).

FIGURA 5. Capacidade pró-oxidante do ácido ascórbico determinada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico.

De acordo com a Tabela 8, podemos perceber que o morango *in natura* apresentou menor atividade antioxidante do que suas respectivas polpas congeladas, mesmo possuindo maior teor de flavonóides (Tabela 4). Isto ocorreu pela presença do ácido ascórbico no fruto (Tabela 2), que agiu negativamente na reação (Figura 6). Através da Figura 6 podemos perceber que a interação entre os flavonóides e o ácido ascórbico não é sinérgica, porque o ácido ascórbico no sistema β -caroteno/ácido linoléico tem um efeito antagonista da atividade antioxidante dos flavonóides, uma vez que a atividade antioxidante da catequina foi neutralizada pela atividade pró-oxidante do ácido ascórbico (Figura 6).

FIGURA 6. Capacidade antioxidante da catequina, pró-oxidante do ácido ascórbico e interação entre a catequina e o ácido ascórbico determinada

A Tabela 8 mostra que as amostras com os maiores teores de cianidina e quercetina, como o açaí e a amora, apresentaram as maiores atividades antioxidantes. A cianidina e a quercetina apresentam um arranjo de cinco hidroxilas vicinais, conseqüentemente possuem uma alta atividade antioxidante (RICE-EVANS *et al.*, 1996). A alta capacidade antioxidante da quercetina pode ser evidenciada através da Figura 7, no qual a quercetina apresentou uma atividade antioxidante muito superior à da catequina e do ácido elágico na mesma concentração molar.

Figura 7. Capacidade antioxidante do ácido elágico, catequina e quercetina a 500 μ M determinada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico.

A amora apresentou atividade antioxidante semelhante à da sua respectiva polpa de laboratório, resultado conseqüente da mesma concentração de vitamina C, flavonóides e fenólicos totais (Tabelas 2, 6 e 7).

De acordo com a Tabela 8, também podemos observar que não ocorreu diminuição da atividade antioxidante durante 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (- 18 °C) das polpas de frutas congeladas.

Tabela 8. Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).

Amostras	% Inibição		
	Controle	6 meses	1 ano
Acerola (<i>Malpighia sp.</i>)			
Fruto <i>in natura</i>	-1 $\pm$ 1	n.a.	n.a.
Polpa de Laboratório	-7 $\pm$ 1	-12 $\pm$ 2	-8 $\pm$ 2
Polpa Comercial (A)	-21 $\pm$ 2	-16 $\pm$ 1	-17 $\pm$ 2
Polpa Comercial (B)	-9 $\pm$ 1	-7 $\pm$ 2	-8 $\pm$ 1
Morango (<i>Fragaria x ananassa</i>)			
Fruto <i>in natura</i>	25 $\pm$ 1 ^a	n.a.	n.a.
Polpa de Laboratório	32 $\pm$ 1 ^b	34 $\pm$ 2 ^b	33 $\pm$ 2 ^b
Polpa Comercial (A)	30 $\pm$ 1 ^b	30 $\pm$ 1 ^b	30 $\pm$ 2 ^b
Polpa Comercial (B)	40 $\pm$ 2 ^c	44 $\pm$ 3 ^c	42 $\pm$ 2 ^c
Amora-preta (<i>Rubus ssp.</i>)			
Fruto <i>in natura</i>	56 $\pm$ 2 ^d	n.a.	n.a.
Polpa de Laboratório	62 $\pm$ 4 ^e	60 $\pm$ 2 ^e	63 $\pm$ 2 ^e
Polpa Comercial (A)	41 $\pm$ 2 ^c	40 $\pm$ 2 ^c	43 $\pm$ 2 ^c
Polpa Comercial (B)	51 $\pm$ 2 ^f	51 $\pm$ 2 ^f	49 $\pm$ 2 ^f
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)			
Fruto <i>in natura</i>	68 $\pm$ 3 ^g	n.a.	n.a.
Polpa Comercial (A)	60 $\pm$ 2 ^e	57 $\pm$ 2 ^e	58 $\pm$ 2 ^e
Polpa Comercial (B)	50 $\pm$ 2 ^f	52 $\pm$ 3 ^f	53 $\pm$ 3 ^f

Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão (n=3). O controle corresponde às amostras antes do armazenamento. Médias com letras iguais não diferem significativamente (p<0,05). n.a. não analisado;

4.5.2. Seqüestro de radicais livres (DPPH)

Como não é possível avaliar adequadamente a capacidade antioxidante de amostras ricas em ácido ascórbico pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, a capacidade antioxidante também foi determinada pelo seqüestro dos radicais DPPH. Este método não detecta agentes pró-oxidantes, sendo que determina apenas o poder redutor dos compostos analisados (BRAND-WILLIAMS, 1995).

De acordo com a Tabela 9, podemos verificar que as amostras de acerola apresentaram as maiores atividades, mesmo possuindo uma menor concentração de flavonóides (Tabela 3), que são compostos fenólicos que possuem alta capacidade redutora (PANNALA *et al.*, 2001). Esta atividade deve-se quase que exclusivamente ao alto teor de ácido ascórbico presente nestas amostras (Tabela 2), comprovando que ao contrário do ocorrido no sistema β -caroteno/ácido linoléico, o ácido ascórbico possui atividade antioxidante neste sistema (Figura 8).

A Figura 8 corrobora que a quercetina possui uma alta atividade antioxidante representada pela porcentagem de seqüestro de radicais livres (% SRL), uma vez que também apresentou neste sistema a maior atividade antioxidante entre os padrões analisados. Neste sistema o ácido ascórbico também apresentou uma alta atividade antioxidante, uma vez que demonstrou uma atividade de apenas 8 % e 30 % (% SRL) menor do que a da catequina e quercetina, respectivamente.

Figura 8. Atividade antioxidante de quercetina, ácido ascórbico e catequina a 50 µM expresso em porcentagem de seqüestro de radicais livres (% SRL).

A acerola apresentou atividade semelhante à da sua respectiva polpa congelada produzida no laboratório, mesmo apresentando concentrações de compostos antioxidantes diferentes. A polpa de laboratório apresentou maior teor de ácido ascórbico do que o fruto, mas em contrapartida apresentou menor concentração de flavonóides (principalmente de antocianinas), o que poderia explicar a equivalência da atividade antioxidante.

As amostras de morango apresentaram as menores atividades, resultado condizente com o menor teor de fenólicos totais (Tabela 7).

A atividade antioxidante para as amostras de açaí foi proporcionalmente semelhante ao resultado obtido pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, no qual o fruto apresentou a maior atividade antioxidante e a polpa comercial “B” a menor (Tabela 8).

A atividade antioxidante das amostras de amora foi proporcional aos teores de flavonóides e fenólicos (Tabelas 6 e 7). O fruto e a polpa congelada de

laboratório apresentaram as maiores atividades e a polpa comercial “A” a menor (Tabela 9).

Também podemos verificar que não houve diminuição da atividade antioxidante, consequência da estabilidade dos compostos fenólicos e do ácido ascórbico durante o armazenamento. Esta afirmação é corroborada por Mullen *et al.* (2002) que analisaram compostos fenólicos e vitamina C de framboesa, e verificaram que não houve alteração na concentração destas substâncias durante o armazenamento a 4 °C por 3 dias e, conseqüentemente manutenção da atividade antioxidante.

Tabela 9. Determinação da atividade antioxidante pelo seqüestro dos radicais DPPH dos frutos e das suas respectivas polpas congeladas antes e após 1 ano de armazenamento em temperatura comercial (-18 °C).

Amostras	µmoles equivalentes de BHT/g amostra (b.u.)		
	Controle	6 meses	1 ano
Acerola (<i>Malpighia</i> sp.)			
Fruto <i>in natura</i>	89 ± 4 ^a	n.a.	n.a.
Polpa de Laboratório	80 ± 2 ^b	77 ± 2 ^b	81 ± 2 ^b
Polpa Comercial (A)	150 ± 7 ^c	147 ± 4 ^c	142 ± 5 ^c
Polpa Comercial (B)	111 ± 4 ^d	100 ± 3 ^d	100 ± 3 ^d
Morango (<i>Fragaria x ananassa</i>)			
Fruto <i>in natura</i>	4,8 ± 0,1 ^a	n.a.	n.a.
Polpa de Laboratório	6,0 ± 0,3 ^b	5,8 ± 0,2 ^b	5,7 ± 0,2 ^b
Polpa Comercial (A)	8,4 ± 0,2 ^c	9,0 ± 0,3 ^c	8,7 ± 0,3 ^c
Polpa Comercial (B)	6,6 ± 0,2 ^b	6,3 ± 0,2 ^b	6,3 ± 0,2 ^b
Amora-preta (<i>Rubus</i> ssp.)			
Fruto <i>in natura</i>	28 ± 0,2 ^a	n.a.	n.a.
Polpa de Laboratório	29 ± 1 ^a	29 ± 1 ^a	30 ± 1 ^a
Polpa Comercial (A)	7,6 ± 0,3 ^b	7,5 ± 0,3 ^b	7,3 ± 0,3 ^b
Polpa Comercial (B)	24 ± 1 ^c	20 ± 1 ^c	22 ± 2 ^c
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)			
Fruto <i>in natura</i>	23 ± 1 ^a	n.a.	n.a.
Polpa Comercial (A)	20 ± 1 ^a	21 ± 1 ^a	21 ± 1 ^a
Polpa Comercial (B)	8,9 ± 0,2 ^b	8,8 ± 0,3 ^b	8,6 ± 0,3 ^b

Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). O controle corresponde às amostras antes do armazenamento. Médias para as mesmas amostras com letras iguais não diferem significativamente (p<0,05).
n.a. não analisado;

5. CONCLUSÕES

O efeito do processamento para obtenção das polpas de frutas congeladas sobre os teores de compostos fenólicos e vitamina C varia de acordo com o fruto. No caso do morango e da amora, as polpas apresentaram teores similares aos seus respectivos frutos. Já para acerola, a separação do epicarpo e das sementes durante o processo de despulpamento ocasionou um aumento do teor de vitamina C e diminuição do teor de flavonóides na polpa.

O armazenamento de polpas congeladas de morango, amora, açaí e acerola em condições comerciais (-18 °C), por até um ano, não afeta os teores de flavonóides, vitamina C, fenólicos totais e atividade antioxidante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, J.P.L.; MARINHO, H.A.; REBELO, Y.S.; SHRIMPTON, R. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v.10, n.4, p.755-758, 1980.
- ANTUNES, L.E.C.; CHALFUN, N.N.J.; REGINA, M.A.; HOFFMANN, A. Blossom and ripening periods of blackberry varieties in Brazil. **J. Am. Pomol. Soc.**, Pennsylvania, v.54, n.4, p.164-168, 2000.
- ARAÚJO, P.S.R.; MINAMI, K. **Acerola**. São Paulo: Fundação Cargill, 1994, 74p.
- ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Activity of pectinylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. **Food Chem.**, Oxford, v.74, p.133-137, 2001.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of Analysis of AOAC**. 16.ed., Washington DC, 1995, 2000p.
- AVIGDORI-AVIDOV, H. **Handbook of fruit set and development**. In: S.P. Monseline, Florida: CRC Press Inc., 1996, p.419-448.
- AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: Metha, 1993, 114p.
- BARRET, R.L.C.; CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. Choque a frio e atmosfera modificada no aumento da vida pós-colheita de tomates: Coloração e textura. **Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v.14, p.14-26, 1994.
- BASSOLS, M.C., MOORE, J.N. **Primeira cultivar de amora-preta sem espinhos lançada no Brasil**. Pelotas: Embrapa, 1981, 13p. (Documentos, 2).

- BAUERNIFEIND, J.C. Vitamins. In: PETERSON, M.S., JOHNSON, A.H. **Encyclopedia of Food Science**. Westport: Avi Publishing Co., 1978, p.788-794.
- BORS, W.; BUETTNER, G.R. The vitamin C radical and its reactions in vitamin C In: PACKER, L.; FUCHS, J. **Health and Disease**, New York: Marcel Dekker Inc, 1997, p.75-94.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, London, v.28, p.25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº1 de 07 de janeiro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, Seção I, p.54.
- BUETTNER, G.R.; SCHAFER, F.Q. Ascorbate (vitamina C) its antioxidant chemistry. **Oxygen Soc. Educ. Prog.**, Iowa, p.1-20, 1997.
- CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. Uma introdução à bioquímica dos radicais livres. In: _____. **Radicais livres em medicina**, Rio de Janeiro: Interlivros, 1996, p.1-3.
- CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: Fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL-FAEPE, 1990, 320p.

- CLIFFORD, M.N. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.80, n.7, p.1063-1072, 2000.
- CORDENUNSI, B.R.; GENOVESE, M.I.; NASCIMENTO, J.R.O.; HASSIMOTTO, N.M.A.; SANTOS, R.J.; LAJOLO, F.M. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. **Food Chem.**, Oxford, v.91, p.113-121, 2005.
- CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, p.2581-2586, 2002.
- DEIGHTON, N.; BRENNAN, F.C.; DAVIES, H.V. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. **J. Sci. Food. Agric.**, Bognor Regis, v.80, p.1307-1313, 2000.
- DEUTSCH, J.C. Dehydroascorbic acid. **J. Chromat. A**, Amsterdam, v.881, p.299-307, 2000.
- GENOVESE, M.I.; SANTOS, R.J.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v.39, n.3, p.67-169, 2003.
- GIL, M.I.; HOLCROFT, D.M.; KADER, A.A. Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.45, p.1662-1667, 1997.

- GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin. Chem.**, Washington DC, v.41, p.1819-1828, 1995.
- HALLIWELL, B.; CHRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.57, p.715-725, 1993.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochem.**, Oxford, v.55, p.481-504, 2000.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.53, p.2928-2935, 2005.
- HERCBERG, S.; GALAN, P.; PREZIOSI, P.; ROUSSEL, A.M.; ARNAUD, J.; RICHERD, M.J.; MALVY, D.; PAUL-DAUPHIN, A.; BRIANCON, S.; FAVIER, A. Background and rational behind the SU. V. Max study, a prevention trial using nutritional doses of a combination of antioxidant vitamins and mineral to reduce cardiovascular diseases and cancers. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, Bern, v.68, n.1, p.3-20, 1998.
- LIMA, V.L.A.G.; MELO, E.A.; LIMA, L.S.; NASCIMENTO, P.P. Flavonóides em seleções de acerola (*Malpighia sp. L.*): Teor de antocianinas e flavonóis totais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.6, p.1063-1064, 2000.
- MAATTA-RIIHINEN, K. R.; KAMAL-ELDIN, A.; TORRONEN, A. R. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.52, n.20, p.6178-6187; 2004.

- MACHILI, L.J. Vitamin E. **Handbook of vitamins: nutritional biochemical, and clinical aspects**. New York: Marcel Dekker, 1984, p.99-146.
- MARCO, G.I. Rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.45, p.594-598, 1968.
- MARKHAN, K.R. **Techniques of flavonóides identification**. London, New York: Academic Press, 1982, 113p.
- MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of antocyanins in food products. **Food Chem.**, Oxford, v.25, p.207-225, 1987.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.48, p.91, 1971.
- MOKADY, S.; COGAN, U.; LIEBERMAN, L. Stability of vitamin C in fruit and fruit blends. **J. Sci. Food. Agric.**, Bognor Regis, v.35, p.452-456, 1984.
- MULLEN, W.; STEWART, A.J.; LEAN, M.E.J.; GARDNER, P.; DUTHIE, G.D.; CROZIER, A. Effect of freezing and storage on the phenolic, ellagitanins, flavonoid, and antioxidant capacity of red Raspberries. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.5197-5201, 2002.
- NIELSEN, S.S. **Food Analysis**. 2.ed. Portland: Book News Inc., 1998, 630p.
- ODIN, A.P. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutation Res.**, Amsterdam, v.386, p.39-67, 1997.

- PANNALA, A.S.; CHAN, T.S.; O'BRIEN, P.J.; RICE-EVANS, C.A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 82, p.1161-1168, 2001.
- PETERSON, J.; DWYER, J. Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.98, n.6, p.677-682, 1998.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v.63, n.7, p.1035-1042, 2000.
- POLING, E.B. Blackberries. **J. Small Fruit Vitic.**, New York, v.14, p.38-69, 1996.
- POZO-INSFRAN, D.D.; BRENES, C.H.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea* Mart.). **J. Agric. Food. Chem.**, Columbus, v.52, p.539-1545, 2004.
- PRICE, K.R.; PROSSER, T.; RIHETIN, A.M.F.; RHODES, M.J.C. A comparison of the flavanol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. **Food Chem.**, Oxford, v.66, p.489-494, 1999.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v.20, n.7, p.933-956, 1996.
- ROCK, C.L.; JACOB, R.A.; BOWEN, P. E. Updated on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E and the carotenoids. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.96, p.693-702, 1996.

- SATUÉ-GRACIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.45, n.9, p.3363-3367, 1997.
- SILVA, S. Dados internacionais de catalogação na publicação. In:_____. **Fruit in Brazil**. São Paulo: Empresa das Artes, p.14-17, 1996.
- SINGH, B.P.; SING, G.; SING, A.K. Changes in postharvest quality of guava affected by preharvest application of crop regulators. **J. Primary Industries**, Singapore, v.24, p.1-9, 1996.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.**, New York, v.299, p.152-178, 1999.
- SMIRNOFF, N.; CONKLIN, P.L.; LOEWUS, F.A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.**, Palo Alto, p.52, p.437-467, 2001.
- SMIRNOFF, N.; WHEELER, G. Ascorbic acid plants: biosynthesis and function. **Crit. Rev. Plant. Sci.**, London, v.3, p.229-235, 2000.
- SMITH, T.J.; YANG, C.S. Effects of food phytochemicals or xenobiotic metabolism. In: HUNAG, M.T.; OSAWA, T.; HO, C.T.; ROSEN, E.T. **Food phytochemicals for cancer prevention I. Fruits and vegetables**. Washington, DC: American Chemical Society, 1994, p.17-48.
- STAFFORD, H.A. **Flavonoid metabolism**. Boca Raton: CRC Press, 1990, 298p.

- THOMAS, J.A. Oxidative stress, oxidant defense, and dietary constituents. In: **Modern Nutrition in health and disease**. 8ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994, p.501-512.
- THOMÁS-BARBERÁN, F.A.; CLIFFORD, M.N. Flavanones, chalcones, and dihydrochalcones: nature, occurrence and dietary burden. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.80, p.1073-1080, 2000. [Review].
- VENDRAMINI, A.L.A.; TRUGO, L.C. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia punicifolia*, L.). **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v.15, n.5, p.664-668, 2004.
- VICKERY, M.L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. London: MacMillan Press, 1981, 335 p.
- VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. New York: John Wiley, 1994, 1361p.
- VOET, D; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, 931p.
- WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. **Plant Physiol.**, Rockville, v.126, p.485-493, 2001.
- WRIGHT, K.P.; KADER, A.A. Effect of slicing and controlled-atmosphere storage on the ascorbate content and quality of strawberries and persimmons. **Postharv. Biol. Technol.**, Amsterdam, v.10, p.39-48, 1997.
- YAHIA, E.M.; CONTREPAS-PADILLA, M.; GONZALES-AGUIAR, G. Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in

- tomato and bell pepper fruits during development, maturation and senescence. **Lebensm.-Technol.**, Londres, v.34, p. 452-457, 2001.
- YAMASHITA, F.; BENASSI, M.T.; TONZAR, A.C. Produtos de acerola: Estudo da estabilidade de vitamina C. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v.23 p.92-94, 2003.
- YANISHILIEVA, N.V.I.; MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chem.**, Oxford, v.54, p.377-382, 1995.
- ZIELIŃSKI, H.; KOZŁOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.48, p.2008-2016, 2000.

7. ANEXOS

FIGURA A 1. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica da acerola (*Malpighia sp.*) *in natura* através da detecção a 525 nm. **Cy**; **Pg**: glicosídeos de cianidina e pelargonidina, respectivamente.

FIGURA A 2. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanol:amônia da acerola (*Malpighia sp.*) *in natura* através da detecção a 270 nm. **Cy**; **Pg**; **Q**; **K**: glicosídeos de cianidina, pelargonidina, quercetina e caempferol, respectivamente.

FIGURA A 3. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica do morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) *in natura* através da detecção a 525 nm. **Cy; Pg:** glicosídeos de cianidina e pelargonidina., respectivamente.

FIGURA A 4. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica do morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) *in natura* através da detecção a 270 nm. **Cy; Pg; Q; K:** glicosídeos de cianidina, pelargonidina, quercetina e caempferol, respectivamente. **Ae:** ácido elágico livre.

FIGURA A 5. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanol:amônia do morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) *in natura* através da detecção a 270 nm. **Q**; **K**: glicosídeos de quercetina e caempferol, respectivamente. **Ae**: ácido elágico livre.

FIGURA A 6. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica do açaí (*Euterpe oleracea* Martius) *in natura* através da detecção a 525 nm. **Cy**: glicosídeo de cianidina.

FIGURA A 7. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica do açai (*Euterpe oleracea* Martius) *in natura* através da detecção a 270 nm. **Cy**; **Lt**: glicosídeos de cianidina e luteolina, respectivamente.

FIGURA A 8. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanol:amônia do açai (*Euterpe oleracea* Martius) *in natura* através da detecção a 525 nm. **Cy**: glicosídeo de cianidina.

FIGURA A 9. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanol:amônia do açaí (*Euterpe oleracea* Martius) *in natura* através da detecção a 270 nm. **Lt:** glicosídeo de luteolina.

FIGURA A 10. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica da amora-preta (*Rubus ssp.* L.) *in natura* através da detecção a 525 nm. **Cy:** glicosídeo de cianidina.

FIGURA A 11. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanólica da amora-preta (*Rubus ssp. L.*) *in natura* através da detecção a 270 nm. **Cy**; **Q**: glicosídeos de cianidina e quercetina, respectivamente. **Ep**: epicatequina.

FIGURA A 12. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanol:amônia da amora-preta (*Rubus ssp. L.*) *in natura* através da detecção a 525 nm. **Cy**: glicosídeo de cianidina.

FIGURA A 13. Cromatograma obtido por análise em CLAE da fração metanol:amônia da amora-preta (*Rubus ssp.* L.) *in natura* através da detecção a 270 nm. **Q:** glicosídeo de quercetina. **C; Ae:** catequina e ácido elágico livre, respectivamente.