

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADES DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LÍVIA DE LACERDA DE OLIVEIRA PINELI

QUALIDADE E POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE MORANGOS *IN NATURA* E
SUBMETIDOS A PROCESSAMENTOS

Brasília
2009

LÍVIA DE LACERDA DE OLIVEIRA PINELI

**QUALIDADE E POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE MORANGOS *IN NATURA* E
SUBMETIDOS A PROCESSAMENTOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr Celso Luiz Moretti

Brasília
2009

LÍVIA DE LACERDA DE OLIVEIRA PINELI**QUALIDADE E POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE MORANGOS *IN NATURA* E
SUBMETIDOS A PROCESSAMENTOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em:

MEMBROS DA BANCA:

Doutor Celso Luiz Moretti
(Presidente da Banca – Embrapa Hortaliças)

Professora Doutora Wilma Maria Coelho Araújo
(Membro Interno – Universidade de Brasília)

Professora Doutora Marileusa Dosolina Chiarello
(Membro externo – Universidade Católica de Brasília)

Professora Doutora Raquel Braz Assunção Botelho
(Membro externo – Universidade de Brasília)

Professora Marie Togashi
(Membro interno – Universidade de Brasília)

Professora Doutora Sandra Fernandes Arruda
(Membro externo – Universidade de Brasília)

Brasília
2009

Pineli, Livia de Lacerda de Oliveira.

Qualidade e potencial antioxidante *in vitro* de morangos *in natura* e submetidos a processamentos/Livia de Lacerda de Oliveira Pineli
Tese de doutorado/ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.
Brasília, 2009.

Área de Concentração: Nutrição humana

Orientador: Dr. Celso Luiz Moretti

1. morango 2. processamento 3. qualidade 4. compostos fenólicos 5. vitamina C. 6. atividade antioxidante *in vitro*

Para Sérgio e Henrique, por levarem
luz à minha vida e sentido a tudo o que faço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que, tenho certeza, trouxe soluções a vários obstáculos que surgiam ao longo do trabalho.

A meus pais, Levy e Sílvia, a meu filho, Henrique, e a meu marido, Sérgio, pela ajuda, pelo carinho e paciência infinitos e por sempre me motivarem a fazer o melhor possível.

Ao Dr. Celso Moretti, por toda a atenção dispensada em meio a tantas atribuições na chefia da Embrapa, pelas orientações, pela oportunidade de trabalhar em um projeto tão relevante para o agronegócio do Distrito Federal e para a segurança alimentar em diversos aspectos, e pela confiança em mim depositada.

À Prof. Wilma, pela amizade, por todos os conselhos, pelas orientações na redação do trabalho, pela paciência e compreensão em momentos difíceis.

À Prof. Marileusa, pela amizade, pelo suporte no laboratório, pelos conselhos racionais, sempre buscando dar praticidade e lógica ao trabalho.

À Prof. Sandra Arruda, por suas orientações nas etapas de avaliação do potencial antioxidante, pelos conselhos e pela atenção sempre que precisei.

Ao Marcos Sodré, pelo apoio indispensável na validação das técnicas, pela paciência, pela obstinação em tornar tudo possível.

A Bianca e João, pelo apoio dado nas atividades executadas na Embrapa Hortaliças.

A minhas alunas e colegas de trabalho do laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Católica de Brasília, Alinne, Andréia (a quem agradeço especialmente pela ajuda na elaboração das figuras), Giselle (a quem agradeço especialmente pela ajuda nas férias, nos preparos de extratos para HPLC), Juliana (a quem agradeço especialmente pela valiosa ajuda nas férias e aos sábados, sempre muito produtivos), Natália, Márcia e Talita, pelo auxílio na montagem dos experimentos e na execução de análises físicas e químicas.

A Michelle, da coordenação geral de laboratórios da UCB, pelo pronto atendimento às minhas sempre urgentes solicitações.

Ao produtor de morangos José Ricardo Alécio, pelo fornecimento de morangos para todas as etapas do trabalho.

Às Faculdades Integradas da Terra de Brasília, por cederem o Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Vegetal para o processamento de polpas.

Ao Laticínio Araguaia, por permitir o uso de suas instalações para processamento de geleia.

Ao CNPq, ao MCT, à UCB e à Embrapa Hortaliças, pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

**“Enquanto não alcançares a verdade, não poderás corrigi-la.
Porém, se a não corrigires, não a alcançarás.
Entretanto, não te resignes”.**
José Saramago

RESUMO

Morangos são frutos interessantes dos pontos de vista sensorial e nutricional. Os frutos são ricos em vitamina C e compostos fenólicos, sendo considerados boas fontes de antioxidantes, de acordo com as recomendações de ingestão diária para os dois componentes. O genótipo e os fatores ambientais afetam a qualidade dos morangos. A alta perecibilidade e sazonalidade afetam o estágio de maturação em que são colhidos e levam à demanda por processamento. Produtos derivados de morangos podem ser a principal forma de ingestão dos nutrientes e antioxidantes desses frutos, em muitos países. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de morangos 'Osogrande' e 'Camino Real', cultivados na região do cerrado brasileiro, em diferentes estágios de maturação, durante o armazenamento refrigerado e após processamentos. Nos experimentos 1 e 2, morangos foram colhidos e selecionados. Foram, então, classificados de acordo com o estágio de maturação (verde – $\frac{1}{2}$ maduro, rosa – $\frac{3}{4}$ maduro e maduro) e embalados (experimento 1). Bandejas de morangos no estágio $\frac{3}{4}$ maduro de ambas as cultivares foram armazenados a 5 e a 15°C por oito dias (experimento 2). A cada dois dias os frutos foram avaliados para índice de qualidade e características físicas e químicas, além da concentração e atividade de antioxidantes. No experimento 3, morangos 'Camino Real' foram colhidos em meses diferentes e processados nas formas de polpa congelada e geleia. Ambos os produtos foram armazenados por 120 dias e as análises foram realizadas mensalmente para cor e antioxidantes. Foram verificadas algumas diferenças nos conteúdos de antocianinas, ácido elágico total e vitamina C em relação à literatura para a cultivar 'Osogrande'. Morangos no estágio $\frac{3}{4}$ maduro em geral apresentaram teores de antioxidantes mais elevados do que no estágio maduro. As principais diferenças entre as cultivares foram verificadas nos teores de fenólicos totais, ácido elágico total, antocianinas e vitamina C. Foi observado que o armazenamento a 5°C foi mais eficiente para a manutenção de algumas características químicas, físicas e sensoriais. Todavia, a condição não foi suficiente para manter a qualidade por mais de quatro dias. As melhores características de qualidade inicial foram observadas para morangos 'Camino Real' para todas as variáveis estudadas. A cultivar 'Osogrande' e o armazenamento a 15°C foram mais associados às variáveis antioxidantes. Entretanto, maior grau de deterioração e de alterações químicas e físicas foi verificado para ambas as cultivares a essa temperatura. Diferenças entre as matérias-primas de polpa e geleia ocorreram principalmente para vitamina C, ácido elágico total, antocianinas e atividade antioxidante. O processamento de geleia afetou mais variáveis do que o de polpa. As variáveis de cor, fenólicos totais, DPPH e FRAP foram menos influenciadas pelo tempo de armazenamento do que as outras características. Apesar das alterações observadas, produtos processados de morango podem ser considerados boas fontes de antioxidantes na dieta brasileira. Estudos *in vivo* precisam ser conduzidos para a definição da biodisponibilidade dos antioxidantes e dos efeitos dose-resposta sobre algumas doenças crônicas, bem como para determinação do tamanho das porções de morangos *in natura* ou processados, relacionado às doses presentes de antioxidantes de morango.

Palavras-chave: morango, armazenamento refrigerado, maturação, processamento, fenóis, vitamina C, antioxidantes.

ABSTRACT

Strawberries are sensory and nutritional interesting fruits. They are rich in vitamin C and phenolic compounds, being considered good sources of antioxidants, according to dietary intake recommendations for both substances. Genotype and environmental factors affect strawberry quality. High perishability and sazonality affect maturation stage in wich fruits are harvested and also lead to fruit processing. Derivative products can be the major source of fruits nutrients intake in many countries. This work aimed at evaluating the quality of 'Osogrande' and 'Camino Real' strawberries grown in the cerrado region of Brazil, at different maturation stages, during the refrigerated storage, and after processings. In experiments 1 and 2, strawberries were harvested and selected. They were then classified according to the maturation stage (green, pink and ripe) and packed (experiment 1). Boxes of pink (commercial ripeness) strawberries of both cultivars were stored at 5 or 15°C for 8 days (experiment 2). Every two days fruits were evaluated for quality index, physical and chemical quality characterisitcs, besides antioxidant concentrations and activity. In the experiment 3, 'Camino Real' strawberries were harvested in different months and processed as frozen pulp and jam. Both products were stored for 120 days and evaluations were performed monthly for color and antioxidants. It was observed some differences in anthocyanins, total ellagic acid and vitamin C, in relation to literature, for 'Osogrande' cultivar. Strawberries in pink stage tended to present higher levels of antioxidants than in ripe stage. Main differences between cultivars were noticed in total phenolic, total ellagic acid , anthocyanins and vitamin C contents. It was observed that the storage at 5°C was more efficient for the maintenance of some chemical, physical and sensory characteristics. However, the condition was not sufficient to keep the quality for up to four days of storage. The best initial characteristics were observed for 'Camino Real' strawberries for all the variables studied. 'Osogrande' cultivar and storage at 15°C were more associated to antioxidant variables. However, higher decay and higher chemical and physical alteration ratings were verified for both cultivars at this temperature. Differences between pulp and jam raw materials occurred, mainly for vitamin C, total ellagic acid, anthocyanins and antioxidant activities. Jam processing affected more variables than pulp's. Color variables, TPC, DPPH and FRAP were less influenced by storage time than other characteristics. In spite of observed alterations, processed strawberry products can be considered good source of antioxidants in brazillian diet. *In vivo* studies must be performed for definition of bioavailability and dose-reponse effects in some chronic diseases, as well as for determination of the size of servings of *in natura* and processed strawberries related to this doses of strawberry antioxidants.

Keywords: strawberry, refrigerated storage, maturation, processing, quality, phenolics, vitamin C, antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

PARTE 1

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 SUBDIVISÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES EM ALIMENTOS DE ORIGEM VEGETAL	24
FIGURA 2 BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS, HIDROXIBENZOICOS E FLAVONOIDES	26
FIGURA 3 ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONÓIS	27
FIGURA 4 ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS ANTOCIANINAS	28
FIGURA 5 PIGMENTOS DERIVADOS DE ANTOCIANINAS ISOLADOS DE MORANGOS	29
FIGURA 6 ESTRUTURA QUÍMICA DE ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS E ÁCIDO ELÁGICO	30
FIGURA 7 ESTRUTURA QUÍMICA DOS ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS MAIS COMUNS	31
FIGURA 8 OXIDAÇÃO DA PENTAGALOIL GLICOSE (A) PARA ELAGITANINO, TELLIMAGRANDINA II (B), FORMAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO (D) PELA HIDRÓLISE DE ÁCIDO HEXAHIDRODIFÊNICO	32
FIGURA 9 METABOLISMO DE FENILPROPANOIDES INDUZIDO PELO STRESS	34
FIGURA 10 ESQUEMA DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	37
FIGURA 11 VIA BIOSINTÉTICA PROPOSTA PARA SÍNTESE DE VITAMINA C EM PLANTAS	41
FIGURA 12 REAÇÃO DE OXIDORREDUÇÃO ENTRE O ÁCIDO ASCÓRBICO E O 2,6 – DICLOROFENOLINDOFENOL	44
FIGURA 13 ILUSTRAÇÃO DOS EVENTOS QUE OS FLAVONOIDES PODERIAM BLOQUEAR OU INIBIR NA FORMAÇÃO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES EM HUMANOS	51
FIGURA 14 LAVOURA DE MORANGO NO INÍCIO DE COLHEITA	70
FIGURA 15 FASES DE MATURAÇÃO DO MORANGO	71
FIGURA 16 EXEMPLOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS ENCONTRADOS NO MORANGO	74
FIGURA 17 MORANGOS CV. ‘FESTIVAL’ COM CONTAMINAÇÃO POR “MOFO CINZENTO” E PODRIDÃO MOLE APÓS 4 DIAS DE ARMAZENAMENTO EM CÂMARA FRIA A 5°C	77

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. (A) COLHEITA E (B) SELEÇÃO E (C) EMBALAGEM DE MORANGOS 'OSOGRANDE' E 'CAMINO REAL'. BRAZLÂNDIA – DF	120
FIGURA 2 UNIDADES EXPERIMENTAIS DE MORANGO DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.....	121
FIGURA 3 PROCESSAMENTO DE POLPA CONGELADA	122
FIGURA 4 PROCESSAMENTO DE GELEIA.....	124
FIGURA 5 ESQUEMA COLORIMÉTRICO CIE LAB	126
FIGURA 6 ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH· PELO ANTIOXIDANTE R..	132
FIGURA 7 REDUÇÃO DO COMPLEXO TPTZ (2,4,6-TRI(2-PIRIDIL)-1,3,5-TRIAZINA) COM FE ³⁺	134

PARTE 2

CAPÍTULO 1

FIGURE 1 QUALITY VARIABLES IN 'OSOGRANDE' AND 'CAMINO REAL' STRAWBERRIES, STORED AT 5 AND 15 ^o C.....	158
FIGURE 2 ANTIOXIDANT VARIABLES IN 'OSOGRANDE' AND 'CAMINO REAL' STRAWBERRIES STORED AT 5 AND 15 ^o C.....	162
FIGURE 3 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS AND CLUSTERS (1, 2 AND 3) IN 'OSOGRANDE' AND 'CAMINO REAL' STORED AT 5 AND 15 ^o C.....	165

CAPÍTULO 2

FIGURE 1 COLOR AND ANTIOXIDANT VARIABLES IN 'CAMINO REAL' STRAWBERRIES JAMS AND FROZEN PULPS, STORED FOR 120 DAYS.....	191
FIGURE 2 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS OF 'CAMINO REAL' STRAWBERRIES FROZEN PULPS (P) AND JAMS (J), STORED FOR 120 DAYS, AND THEIR RAW MATERIALS (RM_P AND RM_J).....	195

LISTA DE TABELAS

PARTE 1

CAPÍTULO 1

TABELA 1. ESTUDOS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE IN VIVO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	53
TABELA 2. MECANISMOS PELOS QUAIS A VITAMINA C PODE INIBIR A ATEROSCLEROSE.....	62
TABELA 3. VALOR NUTRICIONAL DO MORANGO (EM 100 G).....	72

PARTE 2

CAPÍTULO 1

TABLE 1 CHEMICAL CHARACTERIZATION OF 'OSOGRANDE' AND 'CAMINO REAL' STRAWBERRIES AT DIFERENT RIPENING STAGES.....	152
TABLE 2 ANTIOXIDANTS VARIABLES OF 'OSOGRANDE' AND 'CAMINO REAL' STRAWBERRIES AT DIFERENT RIPENING STAGES.....	154

CAPÍTULO 2

TABLE 1 EFFECT OF PROCESSING ON ANTIOXIDANT VARIABLES OF 'CAMINO REAL' STRAWBERRY JAM AND FROZEN PULP.....	184
TABLE 2 PEARSON CORRELATION MATRIX.....	192

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. MODELO DE FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL	205
ANEXO 2 ANÁLISE DE UMIDADE PELO MÉTODO DA ESTUFA	206
ANEXO 3 ANÁLISE DE ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL	207
ANEXO 4 ANÁLISE DE VITAMINA C TOTAL	208
ANEXO 5 ANÁLISE DE FENÓLICOS TOTAIS.....	210
ANEXO 6 ANÁLISE DE ANTOCIANINAS TOTAIS	211
ANEXO 7 ANÁLISE DE ÁCIDO ELÁGICO TOTAL	212
ANEXO 8 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL POR DPPH.....	214
ANEXO 9 ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL POR FRAP	217

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ANEXOS	XIII
INTRODUÇÃO.....	17
PARTE 1 - CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA DA PESQUISA E DOS MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO.....	20
CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	21
1.1.1 Natureza, histórico e estudos de seus efeitos	21
1.1.2 Classes de compostos bioativos presentes em alimentos funcionais	24
1.1.2.1 Compostos Fenólicos.....	24
1.1.2.1.1 Flavonóis	27
1.1.2.1.2 Antocianinas.....	28
1.1.2.1.3 Ácidos fenólicos	29
1.1.2.1.4 Taninos hidrolisáveis e ácido elágico.....	31
1.1.2.1.5 Fatores que influenciam os teores de compostos fenólicos nas plantas	33
1.1.2.1.6 Métodos de determinação de compostos fenólicos	35
1.1.2.2 Vitamina C.....	40
1.1.2.2.1 Classificação e estrutura	40
1.1.2.2.2 Fatores que influenciam a síntese e a degradação de vitamina C	42
1.1.2.2.3 Métodos para determinação de vitamina C.....	43
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO-TRANSMISSÍVEIS (DCNT).....	46
1.2.1 Potencial antioxidante dos compostos fenólicos e da vitamina C	49
1.2.1.1 Potencial antioxidante de compostos fenólicos	49
1.2.1.2 Potencial antioxidante da vitamina C	60
1.2.2 Métodos para avaliação do potencial antioxidante dos alimentos	63
1.2.2.1 Métodos para avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i>	63
1.2.2.1.1 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	64
1.2.2.1.2 Cooxidação do Sistema betacaroteno/ácido linoleico.....	64
1.2.2.1.3 FRAP (Ferric-reducing Antioxidant Power)	65
1.3 MORANGO	65
1.3.1 Histórico e importância	65
1.3.2 Classificação botânica e cultivo.....	67
1.3.3 Valor nutricional e presença de compostos bioativos.....	71
1.3.4 Principais compostos fenólicos em morangos e fontes de variação.....	72
1.3.5 Qualidade pós-colheita e processamentos	76
1.3.5.1 Processamento na forma de polpa	78
1.3.5.2 Processamento na forma de geleia	84
1.4 REFERÊNCIAS.....	86
CAPÍTULO 2 - HIPÓTESE, OBJETIVOS, MATERIAL E MÉTODO DE PESQUISA	119
2.1 HIPÓTESE DA PESQUISA.....	119
2.2 OBJETIVOS	119
2.2.1 Objetivo geral	119
2.2.2. Objetivos específicos	119
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	120
2.3.1 Experimento 1: Caracterização física, química e sensorial de morangos ‘Osogrande’ e ‘Camino Real’ em diferentes estágios de maturação	120

2.3.2 Experimento 2: Caracterização física, química e sensorial de morangos ‘Osogrande’ e ‘Camino Real’ ¾ maduros armazenados a 5 e a 15°C	121
2.3.3 Experimento 3: Caracterização física e química de polpa congelada e geleia de morango cv. Camino Real, armazenadas por 120 dias	122
2.3.3.1 Processamento de polpa congelada de morango.....	122
2.3.3.2. Processamento de geleia de morango	123
2.3.4. Determinações analíticas	124
2.3.4.1 Análise de perda de massa.....	125
2.3.4.2 Análise sensorial	125
2.3.4.3 Análise colorimétrica	126
2.3.4.4 Análise de firmeza.....	127
2.3.4.5 Análise de umidade.....	127
2.3.4.6 Análise de acidez total titulável	127
2.3.4.7 Análise de sólidos solúveis totais.....	128
2.3.4.8 Análise de vitamina C total.....	128
2.3.4.9 Análise de fenólicos totais.....	129
2.3.4.10 Análise de antocianinas totais.....	130
2.3.4.11 Análise de ácido elágico total.....	131
2.3.4.12 Análise do potencial antioxidante <i>in vitro</i> por DPPH	132
2.3.4.13 Análise do potencial antioxidante <i>in vitro</i> por FRAP	133
2.3.5. Análise estatística.....	134
2.3.5.1 Experimento 1	134
2.3.5.2. Experimento 2	135
2.3.5.3. Experimento 3	135
2.4 REFERÊNCIAS.....	136
PARTE 2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	140
CAPÍTULO 1. ELLAGIC ACID, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND OTHER CHEMICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTICS OF TWO STRAWBERRY CULTIVARS GROWN IN THE BRAZILIAN SAVANNAH	141
ABSTRACT	141
1. INTRODUCTION.....	142
2. MATERIALS AND METHODS	144
2.1. Fruit harvest, treatment and storage conditions	144
2.2. Weight loss, overall quality, and decay assessments.....	145
2.3. Color and firmness	146
2.4. Total soluble solids (TSS) and total titratable acidity (TTA)	146
2.5. Determination of total Vitamin C	146
2.6. Extraction and measurement of phenolic compounds and total antioxidant capacity assays	147
2.6.1 Sample extraction	147
2.6.2. Phenolic compounds content	148
2.6.3 Total antioxidant capacity.....	148
2.6.3.1 DPPH radical-scavenging activity	148
2.6.3.2. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).....	148
2.7. Determination of total anthocyanins	149
2.8. Extraction of total ellagic acid	149
2.9. HPLC quantification of total ellagic acid content	150
2.10. Statistical Analysis	150
3. RESULTS AND DISCUSSION	151
3.1. Effects of ripening stage on fruit quality and antioxidants properties	151
3.2. Quality characteristics during refrigerated storage	157

3.3. Antioxidant characteristics during refrigerated storage	161
3.4. Multivariate analysis	164
4. CONCLUSIONS.....	166
5. REFERENCES.....	168
CAPÍTULO 2. COLOR AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF ‘CAMINO REAL’ STRAWBERRY FROZEN PULP AND JAM DURING STORAGE	173
ABSTRACT.....	173
1 INTRODUCTION.....	174
2 MATERIALS AND METHODS.....	175
2.1 Pulp processing	175
2.2 Jam processing	176
2.3 Color	176
2.4 Determination of total Vitamin C	177
2.5 Extraction and measurement of phenolic compounds and total antioxidant capacity assays	178
2.5.1 Sample extraction.....	178
2.5.2 Total Phenolic Contents (TPC).....	178
2.5.3 Total antioxidant capacity.....	179
2.5.3.1 DPPH radical-scavenging activity.....	179
2.5.3.2 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).....	179
2.6 Determination of total anthocyanins	179
2.7 Extraction of total ellagic acid (TEA)	180
2.8 HPLC quantification of total ellagic acid content	180
2.9 Statistical Analysis	181
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	181
3.1 Color variables in raw materials	181
3.2 Antioxidants in raw materials	182
3.3. Processing effects on color	185
3.4 Processing effects on antioxidants	186
3.5 Storage time effects in color	190
3.6 Storage time effects in antioxidants	192
3.7 Multivariate analysis	195
4 CONCLUSIONS.....	196
5 REFERENCES.....	197
CONCLUSÃO	202
ANEXOS	205
APÊNDICE	220

INTRODUÇÃO

Há algumas décadas, estudos epidemiológicos e experimentais revelam correlação negativa entre o consumo de dietas ricas em frutas e hortaliças e os riscos de algumas doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT). Essa correlação se deve a abundância de compostos antioxidantes, como a vitamina C e os compostos fenólicos, presentes nesses alimentos.

Em consequência dessas pesquisas e preocupado com a longevidade da população japonesa e com a necessidade de redução dos gastos com saúde pública, o governo japonês estimulou o consumo de alimentos fontes desses componentes químicos. Surgiu, assim, o conceito de *alimentos funcionais* que, posteriormente também foi adotado em outros países. A legislação brasileira ainda não regulamentou essa categoria de alimentos tal como é definida em outros países; no entanto, estabeleceu os critérios para se considerarem alimentos com “*alegação de propriedade funcional ou de saúde*”.

Substâncias ou Compostos “bioativos” são constituintes extranutricionais, que ocorrem, tipicamente, em pequenas quantidades, especialmente em frutas e hortaliças. Os compostos fenólicos são um dos maiores grupos desses componentes não essenciais à dieta, encontrados em alimentos de origem vegetal, e englobam mais de 8000 diferentes substâncias. Tradicionalmente, têm sido considerados compostos antinutricionais, por causa do efeito adverso dos taninos, principais compostos desta classe, na digestibilidade de proteínas. Todavia, a capacidade dessas moléculas para quelar metais, inibirem a ação da lipoxigenase e combaterem radicais livres ampliou o interesse de pesquisadores por conhecer seus efeitos no organismo humano.

Entre as hortaliças ricas em compostos fenólicos, as frutas vermelhas, ou *berries*, estão entre as fontes mais importantes para as dietas. Esses frutos são oriundos, predominantemente, de regiões subtropicais ou temperadas. Todavia, com os avanços no melhoramento genético e nos conhecimentos agrônômicos, algumas espécies têm sido adaptadas a outras regiões e podem ser cultivadas durante todo o ano. No Brasil, a principal fruta vermelha produzida e consumida é o morango.

A literatura científica mostra que o consumo de morango exerce efeito antioxidante, anti-inflamatório, anticarcinogênico e antineurodegenerativo. Estudos demonstram que as

substâncias relacionadas a essas propriedades são o ácido ascórbico, abundantemente presente na polpa, e os compostos fenólicos. Atualmente, o morango é largamente consumido em todo o mundo, em sua forma *in natura* ou como ingrediente de produtos industrializados ou preparações alimentares. Em meados do século XX houve grande incentivo à produção de morangos no Brasil, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo, onde a cultura alcançou grande desenvolvimento comercial. Trabalhos de pesquisa e melhoramento genético levaram à introdução de cultivares mais adaptadas e a novas técnicas de cultivo, possibilitando ampliação das lavouras para outras regiões. Atualmente, o município de Brazlândia, no Distrito Federal, é o sétimo maior produtor do país e o primeiro da região Centro-Oeste.

Os efeitos fisiológicos desses alimentos têm sido pesquisados no hemisfério norte, em muitos estudos conduzidos para caracterização de substâncias bioativas em alimentos cultivados. Entretanto, pouco se conhece ainda sobre as propriedades funcionais de alimentos que hoje despontam como importantes para o agronegócio brasileiro.

Considerando a importância dessa cultura como fonte potencial de compostos bioativos, o presente trabalho tem como objetivo estudar e determinar a concentração de tais substâncias em morangos de cultivares produzidas no Brasil, avaliando-se as diferenças varietais e os efeitos do armazenamento pós-colheita e do processamento, na atividade desses componentes, visto que no organismo o efeito pode dose-dependente ou depender do sinergismo entre compostos fenólicos diferentes.

PARTE 1

CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E DOS MÉTODOS DE PESQUISA CIENTÍFICA

PARTE 1 - CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA DA PESQUISA E DOS MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO

Na parte 1 da tese são apresentados dois capítulos, referentes à revisão de literatura e aos métodos de pesquisa científica adotados neste trabalho.

No capítulo 1 são apresentadas informações de relevância para a caracterização do problema da pesquisa: o conceito e os aspectos históricos dos alimentos funcionais, a química dos compostos fenólicos bioativos, as relações entre o estresse oxidativo e as doenças crônicas não-transmissíveis, bem como as propriedades protetoras do consumo de alimentos com antioxidantes. Ainda nesse contexto, são abordadas as características da cultura do morango, suas características nutricionais e a presença de antioxidantes fenólicos, bem como fatores que interferem na variação da composição dos frutos. Finalmente, são discutidos os problemas de qualidade pós-colheita do morango e a necessidade de processamento. Os principais produtos processados comercializados no Brasil, polpa congelada e geleia, são caracterizados e os efeitos das operações unitárias adotadas e do armazenamento na cor e nas concentrações de compostos fenólicos são levantados.

No capítulo 2, apresentam-se a hipótese do problema de pesquisa e os objetivos do trabalho. Também são descritos os procedimentos de montagem dos experimentos, o delineamento experimental, os métodos de análises físicas, químicas e sensorial e os procedimentos de análise estatística dos resultados.

CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

1.1.1 Natureza, histórico e estudos de seus efeitos

A literatura científica mostra evidências de efeitos benéficos do consumo de dietas ricas em frutas e hortaliças na diminuição dos riscos de algumas doenças crônicas não-transmissíveis-DCNT (CHEN *et al.*, 2005; MIDDLETON *et al.*, 2000; PRIOR, 2003; SALEEM *et al.* 2002; ZHANG *et al.*, 2005). Esses efeitos fisiológicos, relacionados com o consumo de vegetais, podem ser parcialmente atribuídos à abundância de compostos antioxidantes, como os compostos fenólicos e a vitamina C (VALKONEN & KUUSI, 2000; PRICE *et al.*, 2001; WINTERGERST *et al.*, 2006; KNEKT *et al.*, 2002; SUDHEER *et al.*, 2007a,b; 2005; BICKFORD *et al.*, 2000).

O conceito de alimentos funcionais, primeiramente adotado pelo governo japonês, resultou de esforços para desenvolver alimentos, frescos ou industrializados, que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, em vista da longevidade da população japonesa (ARAI, 1996; HASLER, 1998; ARAYA & LUTZ, 2003; STRINGHETA *et al.*, 2007).

O conceito foi empregado, posteriormente, em vários outros países. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2004) estabeleceu, no documento ***Estratégia Global em Alimentação, Atividade Física e Saúde***, quatro objetivos principais, quais sejam: a) redução dos fatores de risco de doenças crônicas; b) ampliação da consciência e da compreensão sobre a influência da alimentação e da atividade física na saúde e seus impactos em intervenções preventivas; c) desenvolvimento, fortalecimento e implementação de políticas globais, regionais e nacionais, bem como planos de ação para melhoria da alimentação e aumento de atividades físicas e d) monitoramento da ciência e promoção da pesquisa sobre os efeitos das interações entre alimentação e atividade física.

Antes mesmo do estabelecimento dessa estratégia global, o Brasil já traçava suas políticas de saúde em consonância com os princípios de promoção de hábitos alimentares saudáveis, como pode ser verificado nas proposições da ***Política Nacional de***

Alimentação e Nutrição - PNAN (BRASIL, 2003). A legislação brasileira, entretanto, ainda não apresenta definição para alimentos funcionais, definindo, por sua vez, a *alegação de propriedade funcional ou de saúde* (STRINGHETA *et al.*, 2007; ANVISA, 1999a, b, c).

A Comissão Técnico-Científica em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos (CTCAF, ANVISA, 2005) utiliza, como base, o conhecimento científico atualizado para que os alimentos com *alegação de propriedade funcional ou de saúde* possam ser contínua e dinamicamente reavaliados.

A classificação da força da evidência, estabelecida pela WHO/FAO (WHO, 2003) para as recomendações, na prática clínica, para prevenção de doenças, de acordo com a qualidade, quantidade e resultados dos estudos disponíveis, é estabelecida como *evidência convincente, provável, possível e insuficiente*.

Desse modo, a lista de alimentos divulgada pela CTCAF está sujeita, periodicamente, a mudanças em função da publicação de novos estudos, podendo ser inseridos na lista alimentos cuja evidência de propriedade de saúde ou funcional seja convincente, após as análises de novos estudos, bem como podem ser retirados da lista, caso novos estudos tornem a evidência *insuficiente, provável ou possível*.

Uma ampla gama de compostos tem sido estudada como sendo a responsável pelos efeitos benéficos das dietas ricas em frutas e hortaliças (HORST & LAJOLO, 2007), dentre os quais se destacam as substâncias fenólicas. Compostos fenólicos são um dos maiores grupos de componentes, não essenciais à dieta, encontrados em alimentos de origem vegetal, e englobam mais de 8000 moléculas diferentes. Tradicionalmente, têm sido considerados compostos antinutricionais, por causa do efeito adverso dos taninos, principais compostos desta classe, na digestibilidade de proteínas. A capacidade dessas moléculas para quelar metais, inibir a ação da lipoxigenase e combater radicais livres tem, todavia, ampliado o interesse de pesquisadores pelos compostos fenólicos (MARTINEZ-VALVERDE *et al.*, 2000).

A capacidade dos compostos fenólicos de reduzir o risco de doenças induzidas pelo estresse oxidativo ainda não está totalmente compreendida. A maioria dos compostos fenólicos que apresentam efeitos positivos na saúde atua no combate a radicais livres gerados pelo metabolismo celular.

Entre os vegetais ricos em compostos fenólicos, as frutas vermelhas, ou *berries*, estão entre as fontes mais importantes para as dietas (HÄKKINEN & TÖRRÖNEN, 2000; HÄKKINEN, 2000). Esses frutos são oriundos, predominantemente, de regiões subtropicais ou temperadas, mas com os avanços no melhoramento genético e nos conhecimentos agrônômicos, algumas espécies têm sido adaptadas a outras regiões e podem ser cultivadas durante todo o ano (PINTO *et al.*, 2007). No Brasil, a principal fruta vermelha produzida e consumida é o morango.

Os efeitos fisiológicos dos alimentos têm sido pesquisados, no hemisfério norte, em estudos conduzidos para caracterização de substâncias bioativas em alimentos cultivados. Muitos estudos têm sido desenvolvidos para avaliação do potencial antioxidante de morangos na Espanha (HERNANZ *et al.*, 2008; 2007; ALLENDE *et al.*, 2007; LOPES da SILVA *et al.*, 2007; SANLI *et al.*, 2002; MORENO *et al.*, 2000), nos Estados Unidos (AABY *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2007; AYALA-ZAVALA *et al.*, 2004; ASAMI *et al.*, 2003; WANG & LIN, 2003; WANG *et al.*, 2003; 2002; WANG e ZHENG, 2001; KALT *et al.*, 1999; NUNES *et al.*, 1995), na Suécia (OLSSON *et al.*, 2004), na Itália (CAPOCASA *et al.*, 2008; SCALZO *et al.*, 2005), na Turquia (TULIPANI *et al.*, 2008; KAFKAS *et al.*, 2007; KOSAR *et al.*, 2004); na Finlândia (ANTONNEN *et al.*, 2006; MAATA-RIIHINEN *et al.*, 2004; HAKALA *et al.*, 2003; HÄKKINEN & TORRONEN, 2000; HÄKKINEN *et al.*, 1998; TORRONEN *et al.*, 1997), na Polônia (SKUPIEN & OSZMIANSK, 2004), na Noruega (ANDERSEN *et al.*, 2004; FOSSEN *et al.*, 2004; WICKLUND *et al.*, 2005) e na Eslovênia (STURM *et al.*, 2003).

No Hemisfério Sul, estudos foram realizados no Chile (SIMIRGIOTIS *et al.*, 2009) e no Equador (VASCO *et al.*, 2009) nos últimos anos. No Brasil, morangos produzidos na região de São Paulo (PINTO *et al.*, 2008; CORDENUNSI *et al.*, 2005; 2003; 2002, NASCIMENTO *et al.*, 2005; BERBARI *et al.*, 1998) foram recentemente pesquisados. Todavia, não há estudos publicados que efetuem a caracterização física e química, bem como avaliem o potencial antioxidante, *in vitro*, de morangos cultivados na região centro-oeste do Brasil.

O consumo de antioxidantes naturais, oriundos de frutas e hortaliças, parece aumentar a resposta das defesas antioxidantes mediadas por glutathione reduzida, ascorbato, superóxido dismutase e catalase (BLOCK *et al.*, 1992; SERDULA *et al.*, 1996; TAPIERO *et al.*, 2002; DUTHIE *et al.*, 2003).

1.1.2 Classes de compostos bioativos presentes em alimentos funcionais

"Substâncias" ou "Compostos bioativos" são constituintes extranutricionais, que ocorrem, tipicamente, em pequenas quantidades, em alimentos (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002).

A Figura 1 representa as principais classes de compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal.

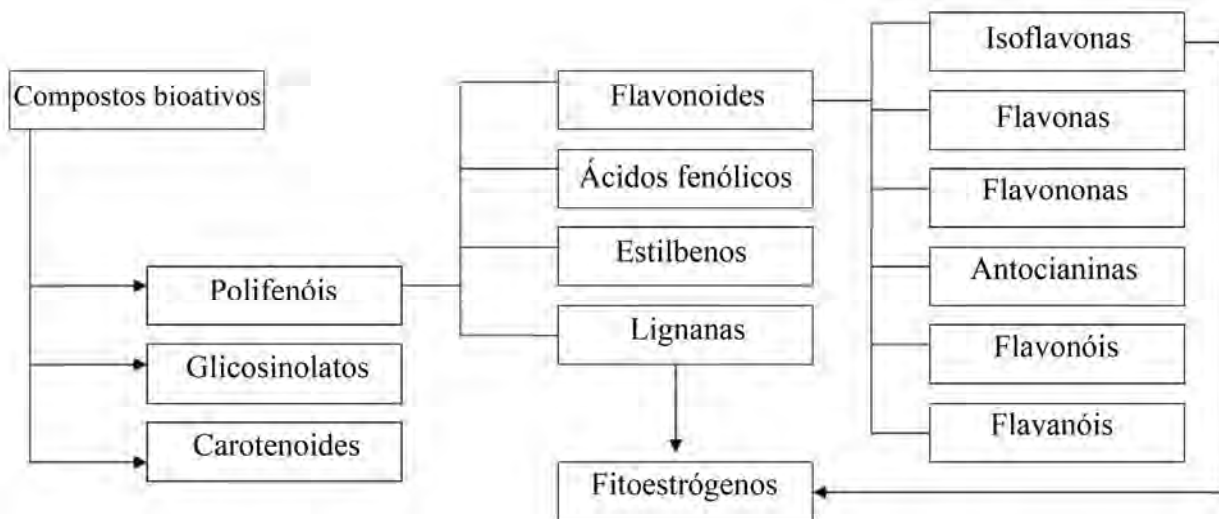


Figura 1 Subdivisão dos compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal (HORST & LAJOLO, 2007)

A categoria dos polifenóis é a mais diversificada entre todas, compreendendo uma ampla variedade de fontes alimentares de origem vegetal.

1.1.2.1 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos contêm anéis aromáticos com um grupo hidroxila. Foram identificadas mais de 8000 estruturas fenólicas categorizadas em 10 classes. Elas variam desde moléculas simples (como os ácidos fenólicos com uma única estrutura aromática), bifenóis (como ácido elágico) e flavonoides, que contêm 2 a 3 anéis aromáticos (HASLAM, 1998), e polifenóis, contendo de 12 a 16 anéis.

De acordo com Melo & Guerra (2002), compostos fenólicos de fontes vegetais podem ser divididos em dois grupos: os flavonoides e os não-flavonoides, ambos metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais, sintetizados a partir fenilalanina, obtida pela via do ácido chiquímico. A fenilalanina, pela ação da fenilalanina amonialiase (FAL), perde uma molécula de amônia, originando o ácido cinâmico. A regulação dessa enzima é um fator crítico na produção de metabólitos do chiquimato. Nas plantas, a atividade da FAL está sob controle de vários fatores externos e internos, tais como hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por fungos e lesões. Por exemplo, a infecção por fungos estimula a síntese de FAL, resultando no aumento da síntese dos compostos fenólicos (SANTOS, 2007). Flavonoides apresentam a estrutura química descrita como $C_6-C_3-C_6$. Não-flavonoides são classificados como: a) derivados das estruturas químicas C_6-C_1 específicas dos ácidos hidroxibenzoicos, gálico e elágico; b) derivados das estruturas químicas dos derivados do ácido hidroxicinâmico, C_6-C_3 , como os ácidos cafeico e p-cumárico hidroxicinamatos e c) derivados das estruturas químicas dos estilbenos e antraquinonas, $C_6-C_2-C_6$, específicas, trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glucosídeo (HARBORNE, 1980).

Todos os compostos fenólicos são derivados de uma via biossintética comum, incorporando precursores das vias do ácido chiquímico e do acetato-malonato (MANN 1978; STRACK 1997).

A Figura 2 representa as relações biossintéticas entre as diferentes classes de polifenóis nos vegetais.

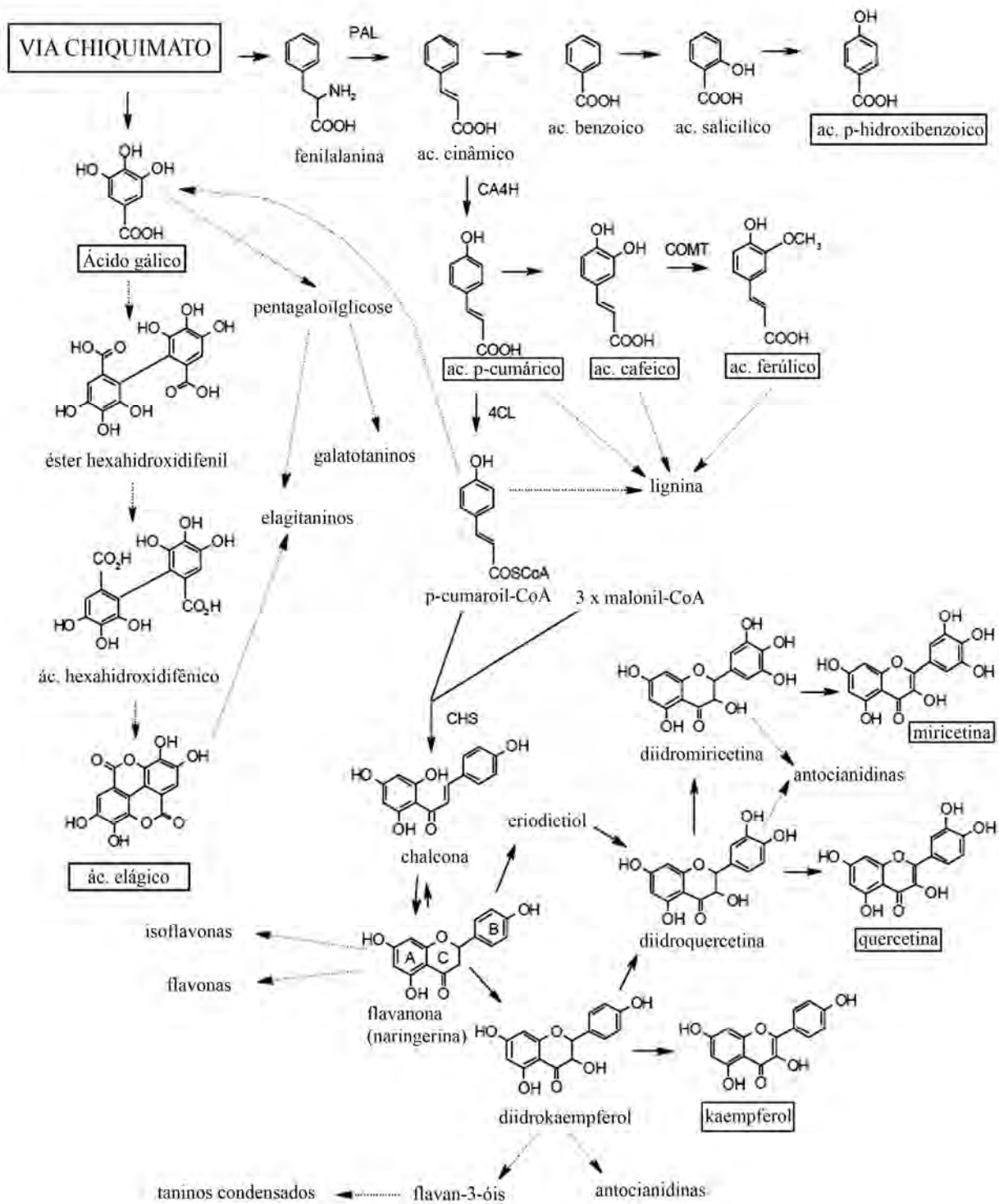


Figura 2 Biossíntese de ácidos hidroxicinâmicos, hidroxibenzoicos e flavonoides (HADDOCK *et al.*, 1982; HARBORNE, 1988; HAHLBROCK & SCHEEL, 1989; MAAS *et al.*, 1992; BENNET & WALLSGROVE, 1994; DIXON & PAIVA, 1995; STRACK, 1997; HÄKKINEN, 2000). Enzimas: CA4H, ácido cinâmico 4-hidroxilase; CHS, chalcona sintase; 4CL, 4-cumarato:coenzima A ligase; PAL, fenilalanina amônia liase.

Segundo Santos (2007), os flavonoides constituem um grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza. Sua presença nos vegetais parece estar associada a funções de defesa e atração de polinizadores.

Flavonoides são compostos que possuem o mesmo núcleo flavona C_{15} ($C_6-C_3-C_6$) (HARBORNE, 1988; MACHEIX *et al.*, 1990), com dois anéis benzênicos (A e B) ligados por meio de anel pirano contendo oxigênio (O), conforme mostrado na Figura 3. O esqueleto básico dos flavonoides resulta de rotas biossintéticas separadas, a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico. A primeira origina a fenilalanina, precursora do ácido cinâmico que, por sua vez, origina o ácido cumárico, responsável por um dos anéis aromáticos (anel B) e a ponte de três carbonos. A segunda resulta no outro anel aromático (anel A). Trata-se de uma estrutura comum aos 3-deoxiflavonoides (flavonois, flavan-3,4 – dióis e flavan-3-óis).

1.1.2.1.1 Flavonóis

Os flavonóis (kaempferol, quercetina e miricetina) são substâncias amarelo-pálidas, fracamente solúveis em água, presentes em flores e folhas de pelo menos 80% das plantas superiores, como também em frutas vermelhas (KÜHNAU, 1976). Ocorrem usualmente como o-glicosídeos, sendo a D-glicose o resíduo de açúcar mais comum. Outros resíduos encontrados são D-galactose, L-ramnose, L-arabinose, D-xilose e ácido D-glucurônico. O principal sítio de ligação é o C3 e, menos frequentemente, a posição C7 (HERRMANN, 1976; 1988).

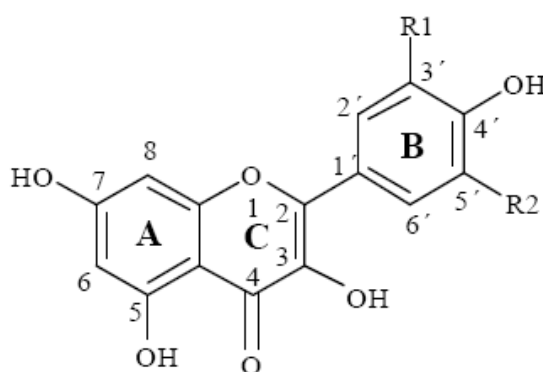


Figura 3 Estrutura química dos flavonóis: kaempferol, $R_1=H$, $R_2=H$; quercetina, $R_1=OH$, $R_2=H$; miricetina, $R_1=OH$, $R_2=OH$ (HÄKKINEN, 2000)

1.1.2.1.2 Antocianinas

As antocianinas, do grego *anthos* (flor) e *kyanos* (azul), termo que foi usado originalmente para descrever os pigmentos azuis da flor da centáurea (*Centaurea cyanus*), compõem um importante grupo de pigmentos vegetais solúveis em água. Foram reportadas cerca de 500 estruturas diferentes de antocianinas, ocorrendo em 27 famílias de plantas. Antocianinas são glicosídeos de derivado de 2-difenilbenzopirílio ou de sais de flavílio (Figura 4). As seis antocianinas mais comumente encontradas são classificadas de acordo com o número e posição dos grupos hidroxis no núcleo flavano e são nomeadas cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina, pelargonidina e petunidina.

As diferenças entre as antocianinas individuais vêm do número e posição dos grupos hidroxis, do grau de metilação, da natureza, número e localização dos açúcares ligados à molécula (GHOSH & KONISHI, 2007; GALVANO *et al.*, 2004). A glicosilação confere maior estabilidade estrutural à antocianidina aparente. A acilação dos açúcares com ácidos cinâmicos ou alifáticos melhora ainda mais essa estabilidade (GHOSH & KONISHI, 2007; MAZZA e MINIATTI, 1993; DANGLES *et al.*, 1993).

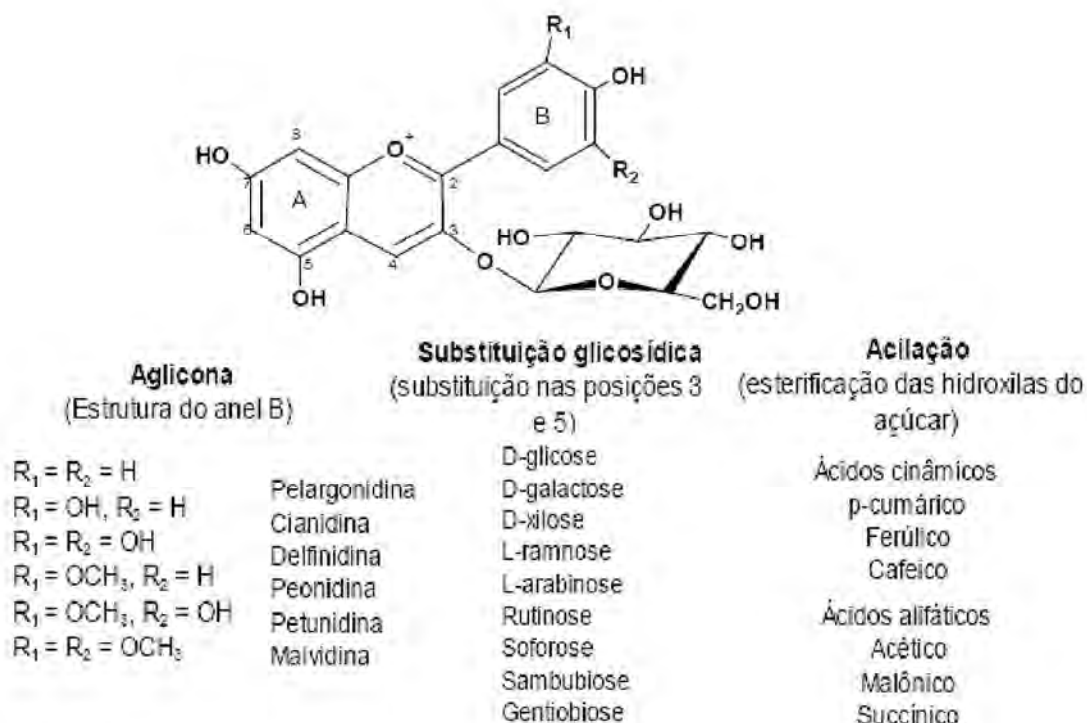


Figura 4 Estruturas químicas das antocianinas (MALACRIDA e MOTA, 2006)

Basicamente, três tipos de pigmentos derivados de antocianinas já foram descritos: a) compostos ligados a grupos etila, resultando na condensação mediada por acetaldeído entre antocianinas e flavanóis; b) derivados de antocianinas 4-substituídos; contendo anéis piranosídicos adicionais no núcleo flavílio (piranoantocianinas) e c) produtos da condensação direta entre antocianinas e flavanóis.

Fossen *et al.* (2004) elucidaram recentemente as estruturas de quatro complexos antocianina-flavanol em extratos de morango, evidenciando que estes consistem de pelargonidina-3-glicosídeo ligada C-C a (epi) catequina e a (epi) afzelequina (Figura 5).

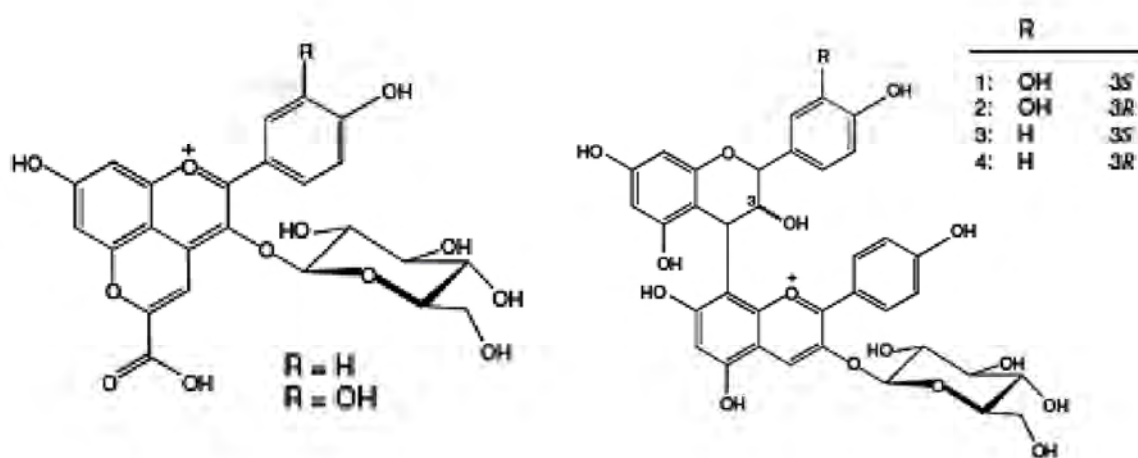


Figura 5 Pigmentos derivados de antocianinas isolados de morangos (Fossen et al., 2004)

1.1.2.1.3 Ácidos fenólicos

Ácidos hidroxibenzoicos:

Ácidos hidroxibenzoicos apresentam uma estrutura geral C_6-C_1 , derivada diretamente do ácido benzoico (Figura 6). As variações nas estruturas individuais dos ácidos benzoicos consistem nas hidroxilações e metilações do anel aromático (MACHEIX *et al.*, 1990). São comumente encontrados quatro tipos diferentes de ácidos fenólicos nesta categoria: p-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico, protocateico, os quais podem estar presentes na forma solúvel conjugada com açúcares ou ácidos orgânicos, bem como ligados a frações das paredes celulares, como na lignina (SCHUSTER & HERRMANN,

1985; STRACK, 1997; HÄKKINEN, 2000). Outro ácido benzoico frequentemente encontrado é o ácido salicílico (2-hidroxibenzoato). O ácido gálico (Figura 7a) é um derivado trihidroxilado que participa da formação dos galatotaninos hidrolisáveis (HASLAM, 1982, HADDOCK *et al.*, 1982, STRACK, 1997). O produto de sua condensação dimérica (ácido hexahidroxi-difênico) e a dilactona correspondente, ácido elágico, são metabólitos comuns das plantas (Figura 7b). O ácido elágico é comumente presente em elagitaninos, como análogos dos ésteres difênicos ligados à glicose (HASLAM, 1982, HADDOCK *et al.*, 1982, MAAS *et al.*, 1992). Na natureza, o ácido elágico existe nas formas livre e complexada, como elagitaninos facilmente hidrolisáveis (WHITLEY *et al.*, 2003).

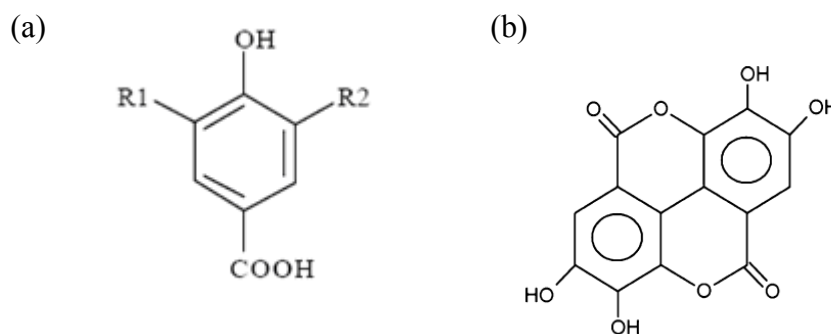


Figura 6 Estrutura química de (a) ácidos hidroxibenzoicos: ácido p-hidroxibenzoico ($R_1=H; R_2=H$) e gálico ($R_1=OH$ e $R_2=OH$) e (b) ácido elágico (HÄKKINEN, 2000)

Ácidos hidroxicinâmicos

Os ácidos hidroxicinâmicos (figura 7) mais amplamente distribuídos em frutas são o p-cumárico, o cafeico, o ferúlico e o sinápico (MACHEIX *et al.*, 1990). Ocorrem em várias formas conjugadas e as formas livres resultam de hidrólise química e enzimática durante a extração do tecido vegetal. As formas conjugadas são ésteres de hidroxiácidos, como o quínico, o chiquímico e o tartárico, além de seus derivados de açúcares (SCHUSTER e HERRMANN, 1985; MACHEIX *et al.*, 1990; SHAHIDI & NACZK, 1995).

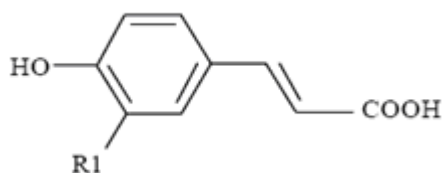


Figura 7 Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos mais comuns: p-cumárico R1 = H, cafeico R1= OH, ferúlico, R1 = OCH3 (HÄKKINEN, 2000)

1.1.2.1.4 Taninos hidrolisáveis e ácido elágico

Flavonoides e ácidos fenólicos podem ser polimerizados em taninos, os quais podem ser classificados como taninos hidrolisáveis e taninos condensados.

Os primeiros são constituídos por diversas moléculas de ácidos fenólicos, como o gálico e o elágico, que estão unidos a um resíduo de glicose central. São chamados de hidrolisáveis, uma vez que suas ligações ésteres são passíveis de sofrerem hidrólise por ácidos ou enzimas. Os taninos condensados são também conhecidos como proantocianidinas, visto que podem dar origem às antocianidinas quando suas estruturas são clivadas por cisão oxidativa. Suas moléculas são mais resistentes à fragmentação e estão relacionadas com os pigmentos flavonoides, tendo uma estrutura polimérica do flavan-3-ol, como a catequina, ou do flavan-3,4-diol, como a leucocianidina (BATTESTIN *et al.*, 2004).

Os taninos hidrolisáveis podem ser galatotaninos ou elagitaninos. Sob hidrólise, os galatotaninos originam glicose e ácido gálico. Já os elagitaninos contêm um ou mais resíduos de hidroxidifenoil, que são ligados à glicose como um diéster, em adição ao ácido gálico. Polímeros de ácido gálico e hexahidroxidifenoil são ligados a moléculas centrais de glicose para formar os elagitaninos (WHITLEY *et al.*, 2003). Quando hidrolisado, o resíduo de hidroxidifenoil sofre lactonização para produção de ácido elágico (Figura 8). Essa reação é a base dos procedimentos usados para sua detecção e quantificação. Elagitaninos são taninos e, por isso, dividem algumas propriedades comuns com as proantocianidinas: são compostos hidrossolúveis de alta massa molar e capazes de precipitar proteínas e alcaloides. Diferem das proantocianidinas em sua ocorrência, que é limitada às famílias das dicotiledôneas.

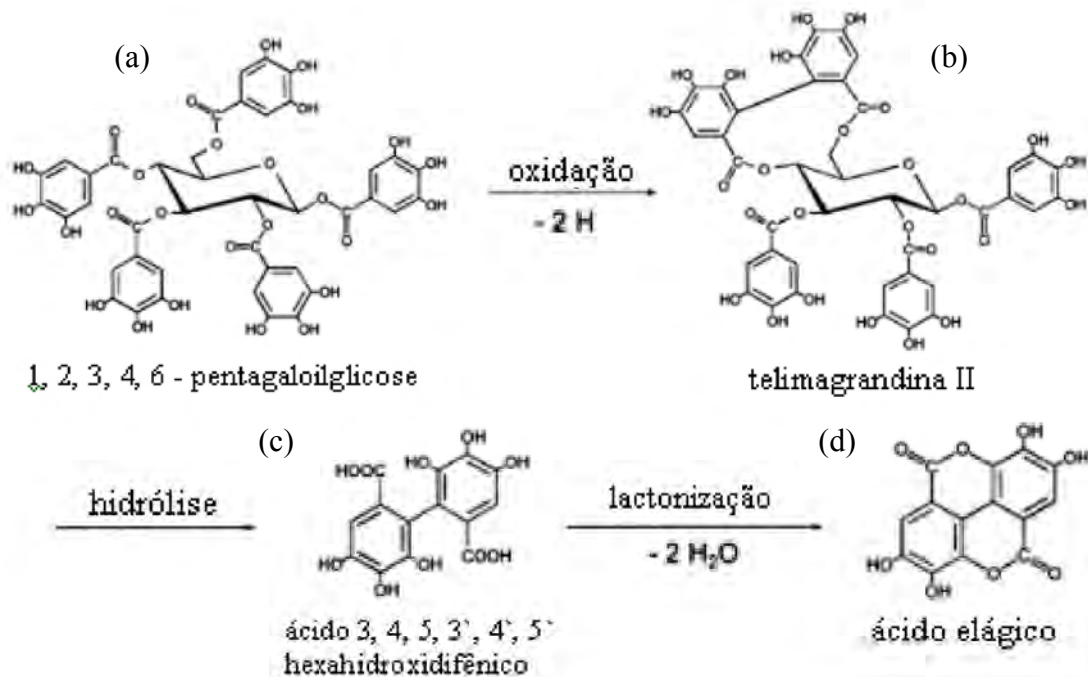


Figura 8 Oxidação da pentagaloil glicose (a) para elagitanino, tellimagrandina II (b), formação de ácido elágico (d) pela hidrólise de ácido hexahidrodifênico (c) como produtos característicos da degradação dos elagitaninos (GRUNDHÖFER *et al.*, 2001)

O ácido elágico (2, 3, 7, 8-tetrahidroxibenzopirano [5,4,3-cde]benzopiran-5-10-diona) está presente nas plantas na forma de taninos hidrolisáveis, como componentes estruturais das paredes e membranas celulares. Sua ocorrência em alimentos é restrita (LARROSA *et al.*, 2006). Esse bifenol é encontrado em altas concentrações em muitas frutas vermelhas, como morangos, framboesas, amoras, mirtilos, uvas (MARWAN & NAGEL, 1986; CHEN *et al.*, 2001) e seus derivados (sucos, geleias e gelatinas), romãs (fruta e suco). Outras fontes são nozes e pecãs (DANIEL *et al.* 1989); bebidas destiladas (GOLDBERG *et al.*, 1999) e vinhos envelhecidos em carvalho (CLIFFORD & SCALBERT, 2000). De acordo com Pinto *et al.* (2007), o morango representa a principal fonte de ácido elágico da dieta brasileira.

1.1.2.1.5 Fatores que influenciam os teores de compostos fenólicos nas plantas

Compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário vegetal. O metabolismo secundário é aquele que responde às condições ambientais (clima e solo) a que está submetida a planta. A função destes metabólitos é a proteção da planta contra estresses biológicos e ambientais e eles são, portanto, sintetizados em resposta a ataques de fungos, infecções bacterianas, alta exposição a energia radiante ou exposição prolongada a raios ultravioletas (CROZIER *et al.*, 2000; BRAVO, 1998).

A produção de metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação dessas moléculas (WINK, 1990). Cada um desses processos é governado por genes e, portanto, influenciado por três fatores principais: hereditariedade (cultivar), ontogenia (estágio de desenvolvimento da planta e do fruto) e ambiente (ROBBERS *et al.*, 1996). Santos (2007) relata que as rotas dos metabólitos secundários só são ativadas em alguns estágios particulares do desenvolvimento ou em períodos de estresse causado por limitações nutricionais ou ataque microbiológico.

Portanto, fatores genéticos e ambientais nas fases pré e pós-colheita podem afetar o metabolismo de síntese e consumo dos antioxidantes fenólicos. O tipo de cultivar, o ataque por pragas e parasitas, os tratos culturais, a incidência de luz e a temperatura ambiente são alguns dos importantes fatores na fase pré-colheita (Figura 9). Por outro lado, o grau de estresse mecânico, a exposição à luz, a disponibilidade de oxigênio e a temperatura de armazenamento podem afetar a composição dos frutos na fase pós-colheita.

A formação dos flavonoides é acelerada pela luz. Conseqüentemente, em plantas cultivadas em estufas, em que os raios ultravioletas são bloqueados, o conteúdo de flavonoides é reduzido. Vegetais que crescem na Espanha ou na África do Sul são apontados como contendo de 4 a 5 vezes mais flavonoides que os que crescem no Reino Unido (AHERNE & O'BRIEN, 2002; BURNS *et al.*, 2001; SELLAPPAN *et al.*, 2002). Diferenças significativas nos teores de vitamina C, fenólicos totais e composição de flavonoides foram encontradas por Pinto *et al.* (2008) e Cordenunsi *et al.* (2005) entre cultivares de morangos produzidos no estado de São Paulo.

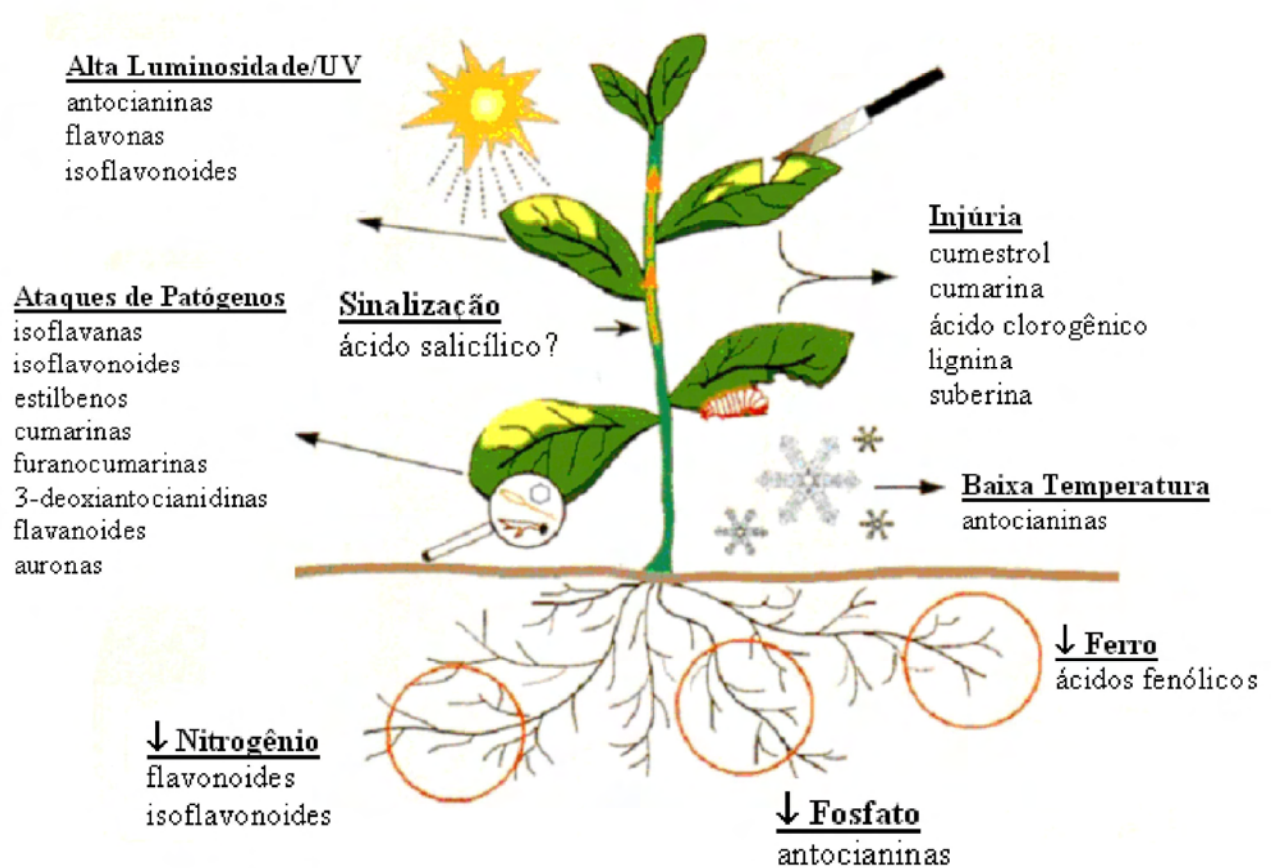


Figura 9 Metabolismo de fenilpropanoides induzido pelo stress (Adaptado de DIXON & PAIVA, 1995).

De acordo com Santos (2007), em função da importância de vários metabólitos secundários para as áreas farmacêutica e de alimentos, o estudo de sua biogênese e regulação tem crescido de maneira notável nos últimos anos. Somente por meio desse conhecimento é possível ao homem interferir racionalmente sobre o organismo vegetal produtor, de forma a direcionar a síntese de compostos de interesse para a saúde.

Finalmente, deve-se considerar que um dos aspectos mais importantes das alegações de funcionalidade e propriedade de saúde é a concentração da substância bioativa no alimento, visto que o efeito no organismo pode ser dose-dependente.

1.1.2.1.6 Métodos de determinação de compostos fenólicos

De acordo com Robards (2003), a estratégia comum para análise de polifenóis envolve purificação dos fenólicos presentes em uma matriz complexa, seguida de identificação e quantificação de seus constituintes.

Considerações sobre preparo de amostras

O preparo da amostra é uma etapa crítica, especialmente quando os componentes da matriz são biologicamente ativos e os analitos representam um espectro de numerosos componentes, muitos dos quais sem identidade definida (ANTOLOVICH *et al.*, 2000).

Métodos de extração são elaborados com a finalidade de se obter um extrato enriquecido com os compostos de interesse e livre de componentes interferentes (ROBARDS, 2003). A diversidade estrutural dos compostos fenólicos interfere em seu comportamento físico-químico (solubilidade, coeficiente de partição, constante de ionização), dificultando, assim, a otimização na ressuspensão dos fenólicos (TURA & ROBARDS, 2002). Fenólicos de plantas são solúveis em água e em solventes orgânicos, ionizáveis em pKa entre 8 e 12, com coeficiente de partição água/óleo entre 6×10^{-4} e 1,5. Uma vez que estes compostos são facilmente oxidáveis por fatores físicos, químicos ou enzimáticos, são utilizados, para proteção dos fenóis contra processos deteriorativos, procedimentos que incluem o uso de antioxidantes como BHT, TBHQ, EDTA e ácido ascórbico, de atmosferas inertes e de supressão da luz (PINTO *et al.*, 2008; SHIN *et al.*, 2007; NACZK & SHAHIDI, 2004; ROBARDS, 2003; TURA & ROBARDS, 2002, SANLI *et al.*, 2002; HAKKINEN, 2000; ANTOLOVICH *et al.*, 2000). Metanol, em concentrações superiores a 70%, reduz a atividade das polifenol oxidases e preserva os polifenóis da oxidação durante o processo de extração (ROBARDS, 2003).

Entre os procedimentos comumente adotados podem ser citadas as múltiplas etapas de extração em solventes e pré-concentração, a extração em fase sólida, a extração líquido-líquido e a filtração (ANTOLOVICH *et al.*, 2000).

Solventes de diferentes polaridades são comumente utilizados na extração de polifenóis, como água, acetato de etila, dimetilsulfóxido e misturas aquosas de metanol,

etanol e acetona (PINTO *et al.*, 2008; SHIN *et al.*, 2007; MALACRIDA & MOTA, 2006; NACZK & SHAHIDI, 2004; ANTOLOVICH *et al.*, 2000).

Em geral, metanol extrai açúcares, ácidos orgânicos e fenóis de baixo peso molecular; acetato de etila e éter dietílico extraem fenóis de baixo peso molecular, enquanto acetona é enriquecida com polifenóis poliméricos.

A acidificação do solvente tem sido empregada em algumas situações para alterar a composição fenólica e aumentar a solubilidade de alguns compostos, auxiliando na sua determinação (NACZK & SHAHIDI, 2004). Os métodos para análise de antocianinas requerem extração prévia das antocianinas da matriz alimentícia. As antocianinas, em pH baixo, encontram-se predominantemente na forma de cátion flavílio, o qual apresenta coloração vermelha em solução aquosa. Em pH alto, esse cátion é convertido em outras espécies incolores (MALACRIDA & MOTA, 2006; REVILLA *et al.*, 1998). O fato de o cátion flavílio ser estável em pH ácido levou à utilização de solventes contendo ácidos orgânicos ou minerais na extração de antocianinas de frutas e vegetais (MACHEIX *et al.*, 1990).

A hidrólise ácida é recomendada para medir agliconas e ácidos fenólicos, de glicosídeos de flavonoides e de ésteres de ácidos fenólicos, respectivamente (ROBARDS, 2003). Pinto *et al.* (2008) determinaram as melhores condições de hidrólise para quantificação de ácido elágico total em morangos. Os solventes avaliados foram metanol (70%, 80% e 100%) e acetona (80%). Para o processo de hidrólise, a adição de 2 mL de ácido trifluoracético (TFA) ou de HCl em concentrações que variaram entre 1,2N a 2N foram comparadas em diversas combinações de tempo e temperatura. O procedimento mais eficaz foi aquele realizado com extração em acetona 80% e hidrólise com adição de TFA 2N, a 120°C, por 60 minutos.

A extração em fase sólida (EFS) é uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas. A EFS emprega sorventes recheados em cartuchos, nas formas de barril ou seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno, contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente (sílica, poliamida, octadecil, entre outros), com 40-60 µm de tamanho de partícula, fixado no tubo por dois filtros.

Em geral, os procedimentos de EFS contêm as seguintes etapas (Figura 10): a) ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; b) condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; c) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; d) limpeza da coluna, para retirar os interferentes menos retidos que o analito; e) eluição e coleta do analito (MACHEREY-NAGEL, 2008).

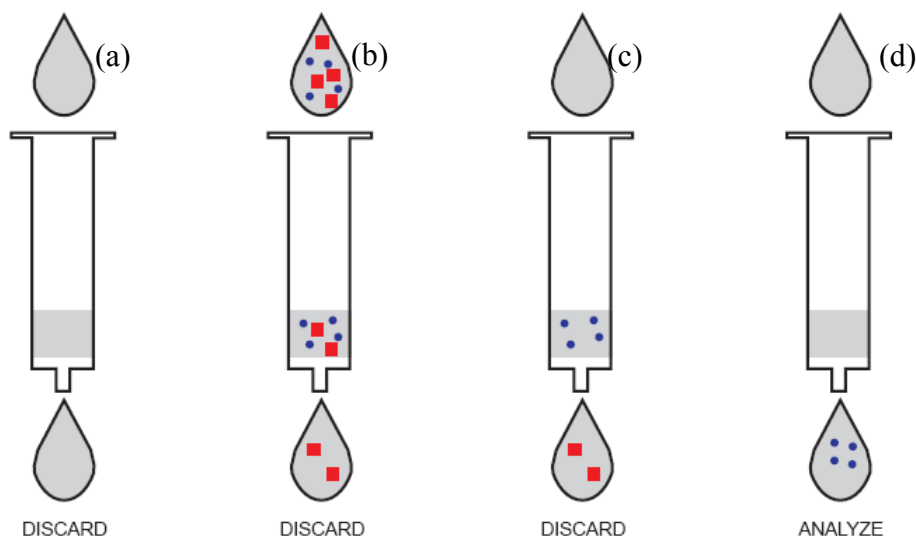


Figura 10 Esquema da extração em fase sólida (MACHEREY-NAGEL, 2008) (a) condicionamento; (b) aplicação da amostra, (c) limpeza da coluna e remoção dos interferentes; (d) eluição do analito

Entre as vantagens da EFS, em comparação com a extração líquido-líquido, podem ser citados o menor consumo de solventes, maior rapidez e o potencial para automação do preparo de amostras.

O método de EFS é eficaz para eliminação das impurezas, tais como substâncias polares e não fenólicas. Março *et al.* (2008) relatam que procedimento para purificação das antocianinas envolve a aplicação do extrato antociânico bruto no cartucho contendo material sorvente, seguido da eluição dos componentes individuais com solventes apropriados. As antocianinas ficam fortemente ligadas aos adsorventes por seus grupos hidroxil não-substituídos. Desta forma, primeiramente são eluídas as substâncias mais polares que as antocianinas, tais como açúcares, ácidos e substâncias solúveis; posteriormente, são eluídos os pigmentos antociânicos.

Determinação de compostos fenólicos

Os principais métodos de determinação de compostos fenólicos em alimentos e bebidas envolvem técnicas espectrofotométricas ou cromatográficas, com detectores por absorvância na região ultravioleta, ou de arranjos de diodo, associadas ou não à espectrometria de massa (NACZK & SHAHIDI, 2004).

A análise pode consistir em um perfil detalhado dos polifenóis ou apenas na soma do total de fenólicos de uma amostra.

O método Folin-Denis (FOLIN & DENIS, 1912) é o mais adotado para análise de fenólicos totais em material vegetal. O reagente de Folin-Denis é composto por tungstato de sódio, ácido fosfomolibdico e ácido orto fosfórico. A redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, resultando em um complexo azul em solução alcalina, ocorre na presença de compostos fenólicos.

Singleton & Rossi (1965) modificaram este método para análise de fenólicos totais, visto que este era sujeito a precipitações que interferiam na leitura colorimétrica, sendo, atualmente, um procedimento analítico amplamente utilizado. Todavia, o novo método ainda está sujeito à interferência de antioxidantes como ácido ascórbico e sulfito, especialmente se estiverem em quantidades elevadas em relação aos teores de fenólicos. Adicionalmente, altas concentrações de açúcares levam à formação de reductonas reativas na solução alcalina final, principalmente se aquecido, e aminas aromáticas podem reagir com fenóis (SINGLETON, 1974).

O método Folin-Ciocalteu é muito sensível à redução pelos fenóis. O número de hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a intensidade da cor formada. O grupo fenólico deve estar na forma de fenolato para que os ânions molibdo e tungstofosfato possam produzir a oxidação (OUGH & AMERINE, 1988).

Para o estabelecimento de métodos de separação, identificação e quantificação de compostos polifenólicos, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), é o método escolhido por causa de sua versatilidade, precisão, sensibilidade e relativa rapidez na obtenção dos resultados.

Segundo Sanli *et al.* (2002), os dois fatores mais críticos para otimização da separação são o pH e a percentagem de solvente orgânico na fase móvel. Para se avaliar o efeito da concentração do solvente orgânico na fase móvel é estabelecida a relação entre os parâmetros de retenção e a polaridade do solvente, definida na escala de Reichardt normalizada (E_T^N). O pH da fase móvel é o principal fator que influencia o comportamento cromatográfico dos polifenóis, por causa de suas funções ionogênicas, tais como as funções carboxílicas e hidroxílicas. A retenção depende da proporção das espécies ionizadas e não ionizadas de cada composto. Sanli *et al.* (2002) estudaram o efeito de diferentes concentrações de acetonitrila e do pH da fase móvel no comportamento cromatográfico de misturas de polifenóis e de extratos de morango. Foi verificado que o pka das substâncias fenólicas aumentava com o aumento da proporção de acetonitrila em relação à água. Além disso, a redução do pH até 4,0-4,5 e as menores concentrações de solvente orgânico (10-13%) acarretaram maior tempo de retenção e melhor resolução dos cromatogramas. O pH e a força iônica da fase móvel influenciam a retenção dos fenólicos na coluna, dependendo da protonação, dissociação ou dissociação parcial (MARKO-VARGA & BARCELO, 1992). A alteração no pH, que acarreta a ionização da amostra, reduz o tempo de retenção numa coluna de fase reversa. Então, pequenas quantidades de ácido acético (2-5%), fórmico ou trifluoroacético (0,1%) são incluídas no sistema para manter o pH abaixo do pka dos compostos e suprimir a ionização dos grupos fenólicos e carboxílicos, melhorando, desta forma, a resolução e a reprodutibilidade das corridas cromatográficas.

Os sistemas de solventes mais usados na análise por CLAE incluem eluição em gradientes binários, com soluções aquosas de ácido acético, fórmico ou fosfórico, com metanol ou acetonitrila como modificador orgânico da fase móvel (PINTO *et al.*, 2008; ALLENDE *et al.*, 2007; KOSAR *et al.*, 2004; HAKKINEN, 2000; PRICE *et al.*, 1999; LISTER *et al.*, 1994; TOMÁS-LORENTE *et al.*, 1992).

Uma vez que polifenóis absorvem luz na região UV, um detector UV-visível é comumente utilizado para identificação e quantificação destes compostos, em vários comprimentos de onda. De acordo com Hakkinen (2000), derivados do ácido benzoico apresentam, geralmente, máxima absorbância entre 246-262nm. Ácidos hidroxicinâmicos possuem dois picos de absorbância: entre 225 e 235nm e entre 290 e 330nm. A maioria dos trabalhos adota comprimento de onda entre 260 e 280nm para a análise de ácidos

fenólicos em geral, flavan-3-óis e flavonóis glicosilados. Por outro lado, a faixa de 350 a 370nm é mais indicada para determinação de flavonóis agliconas (ROBARDS, 2003; HAKKINEN, 2000). Comprimentos de onda entre 500 e 530nm são mais adequados para a análise de antocianinas.

A ampla utilização do detector de arranjo de diodos (DAD) tem sido atribuída a sua habilidade de leitura em vários comprimentos de onda simultaneamente, obtendo-se o espectro de absorção do composto. Desta forma, melhora-se o processo de identificação do pico e a avaliação de sua pureza.

1.1.2.2 Vitamina C

1.1.2.2.1 Classificação e estrutura

A vitamina C é considerada um nutriente essencial, por prevenir contra escorbuto, doença causada por sua deficiência. Sua importância cresceu ao longo do tempo, em grande parte por causa da descoberta de seu potencial antioxidante (SILVA & COZZOLINO, 2007).

A vitamina C, também denominada ácido ascórbico, L-ascórbico, deidroascórbico, ascorbato ou vitamina antiescorbútica, é sintetizada pela maioria dos vegetais e animais a partir da D-glicose ou D-galactose, via ácido glucurônico. Nos vegetais, o ácido deidroascórbico corresponde a menos de 10% do teor encontrado de vitamina C (CORDENUNSI *et al.*, 2005).

Em uma via biossintética proposta (SMIRNOFF, 2000), como indicado na Figura 11, glicose-6-P pode dar origem à GDP-manose, pela ação de diversas enzimas. GDP-galactose é produzida por uma dupla epimerização da GDP-D-manose, sendo posteriormente quebrada a L-galactose livre, por enzimas ainda não caracterizadas. A enzima L-galactose desidrogenase oxida L-galactose a L-galactono-1,4-lactona, precursor imediato do ascorbato. Provavelmente, as reações descritas ocorrem na matéria vegetal em nível citosólico, enquanto o último passo, a oxidação da L-galactono-1,4-lactona (LGL), é mitocondrial. A LGL - desidrogenase encontra-se ligada à membrana interna da mitocôndria. A LGL doa elétrons ao citocromo c entre os complexos III e IV, sendo convertida, assim, a ascorbato.

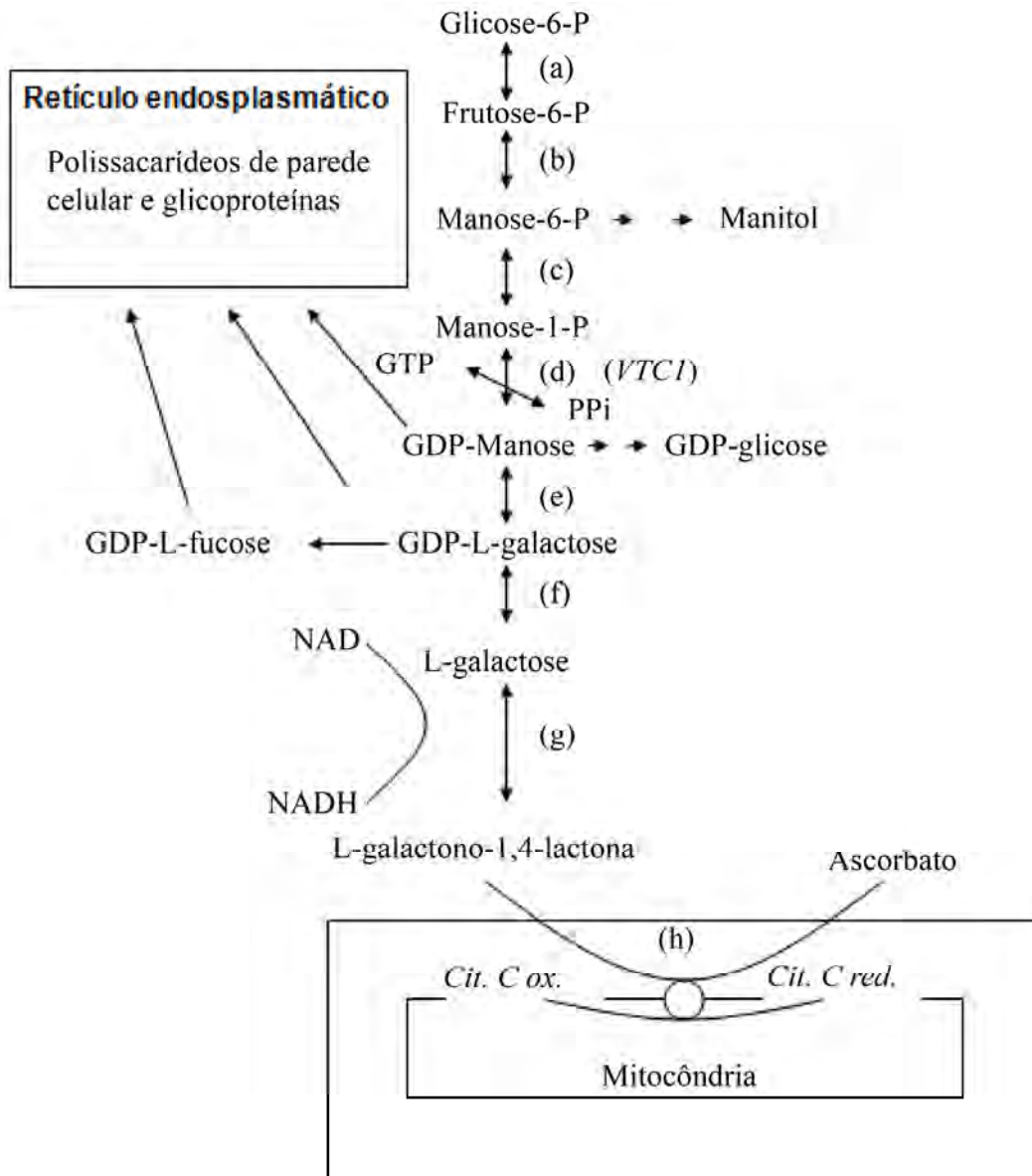


Figura 11 Via biossintética proposta para síntese de Vitamina C em plantas (Adaptado de SMIRNOFF, 2000).

As enzimas são: (a) glicose fosfato isomerase, (b) fosfomanose isomerase, (c) fosfomanose mutase, (d) GDP-manose pirofosforilase, (e) GDP-manose-3,5-epimerase, (f) e (g) enzimas não-caracterizadas, (h) L-galactono-1,4-lactona desidrogenase.

1.1.2.2.2 Fatores que influenciam a síntese e a degradação de vitamina C

De acordo com Cordenunsi *et al.* (2003), o conteúdo de vitamina C em frutas e hortaliças depende de vários fatores, tais como as diferenças genótípicas, as condições edafoclimáticas da fase pré-colheita e a manipulação pós-colheita.

Grande variação genotípica no teor da vitamina foi observada primeiramente por Stevens (1974) e Harris (1975). Outros fatores pré-colheita incluem as condições climáticas e as práticas culturais (SOMERS & BEESON, 1948; LEE, 1974; HARRIS, 1975; MOZAFAR, 1994; WESTON & BARTH, 1997). Lee & Kader (2000) relataram que maiores intensidades luminosas durante a fase de crescimento das plantas acarretam maiores concentrações de vitamina C nos tecidos do vegetal. Fertilizantes nitrogenados em altas doses tendem a fazer decrescer as concentrações da vitamina. Em muitas espécies vegetais a frequência menor de irrigação pode aumentar a síntese de ascorbato. Temperatura e atmosfera de armazenamento na fase pós-colheita também podem afetar a retenção da vitamina. Embora Kader (1988) tenha relatado maior perda de vitamina C quando os vegetais são armazenados a temperaturas de refrigeração mais elevadas, algumas espécies vegetais, como a batata, e suas variedades, podem apresentar comportamento oposto (PINELI, 2005).

Alende *et al.* (2007) avaliaram o efeito da aplicação de atmosfera modificada, ozônio e luz ultravioleta – C no controle de processos de deterioração pós-colheita de morangos. Os autores reportaram que amostras tratadas com ozônio apresentaram menores teores de vitamina C ao fim do armazenamento. As concentrações de vitamina C total observadas para todos os tratamentos ficaram em torno de 300mg.kg⁻¹MF.

Cordenunsi *et al.* (2005) avaliaram, durante o armazenamento refrigerado, três cultivares de morango, cultivados no estado de São Paulo, e observaram valores entre 470 e 800mg.kg⁻¹ MF de vitamina C total, sendo as maiores concentrações encontradas no cultivar Campineiro. Flutuações nos perfis de vitamina C total e de ácido ascórbico indicaram a síntese de vitamina C durante o armazenamento e que temperaturas mais baixas influenciaram a manutenção da vitamina. Em outro trabalho, Cordenunsi *et al.* (2003) observaram redução de 50% de ácido ascórbico em todas as variedades de

morango armazenadas sob refrigeração por 6 dias. Concluíram que os teores de vitamina C no momento da colheita e suas alterações durante o armazenamento dependem da cultivar, das práticas culturais, da intensidade de luz e das condições climáticas.

1.1.2.2.3 Métodos para determinação de vitamina C

Muitos métodos analíticos para determinação de vitamina C têm sido reportados. Análises titulométricas, espectrofotométricas e cromatográficas são as mais adotadas atualmente.

A análise titulométrica (SABINO *et al.*, 2005; AOAC, 1990) baseia-se na utilização do 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) como titulante. Este método é usado para amostras com baixo teor de vitamina C, por exemplo, sucos de frutas. Consiste na redução do corante sal sódico de 2,6-diclorofenol indofenol por uma solução ácida de vitamina C. Já o método iodométrico (SABINO *et al.*, 2005) é baseado na ação redutora do ácido ascórbico, fazendo uso de solução padrão de iodo e tiosulfato de sódio e solução de amido como indicador.

Apesar da rapidez dos resultados, esses métodos são pouco específicos e pouco sensíveis. Os reagentes são instáveis e requerem padronização antes do uso. Além disso, se a amostra é colorida o ponto final da titulação é dificultado (AYDOGMUS *et al.*, 2002). De acordo com Rahman *et al.* (2007) substâncias naturalmente presentes nas frutas, tais como taninos, betaninos, Cu^{+2} , Fe^{+2} e Co^{+2} são também oxidados, causando interferência na análise.

Para determinação de vitamina C em frutas e hortaliças é amplamente utilizado um método espectrofotométrico com dinitrofenilhidrazina (DNPH), simples e bem estabelecido. Neste método, o ácido ascórbico (AA) é oxidado a osazona pelo DNPH após acidificação com ácido sulfúrico (ODRIOZOLA-SERRANO *et al.*, 2007). A etapa de extração é realizada com uma mistura de ácido metafosfórico e ácido acético glacial. O ácido metafosfórico (HPO_3) é um quelante que estabiliza o AA, pela inativação da ascorbato oxidase e pela complexação de íons metálicos, impedindo a sua oxidação além de ácido 2,3 dicetogulônico (EITENMILLER & LANDE, 1999). Adicionalmente, este ácido atua na eliminação de interferentes ao precipitar proteínas. Após centrifugação a frio e filtração, uma alíquota é misturada com o oxidante diclorofenolindofenol (DCPIP), com o

intuito de converter todo o AA em ácido dehidroascórbico (ADA) (Figura 12), o que permite a quantificação da vitamina C total (AA + ADA).

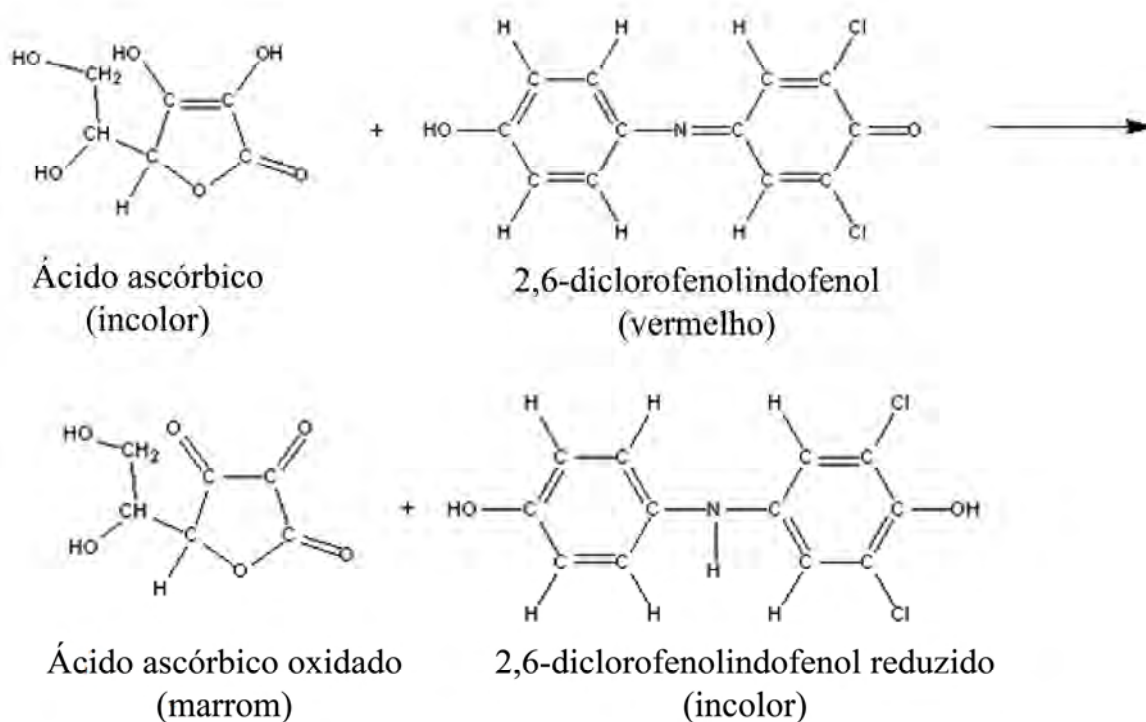


Figura 12 Reação de oxidorredução entre o ácido ascórbico e o 2,6 – diclorofenolindofenol (RAHMAN *et al.*, 2007)

Após a reação de oxidação, adiciona-se tioureia, agente redutor, o que impede que oxidantes como Fe^{3+} e H_2O_2 interfiram na coloração final. O DNPH adicionado imediatamente antes da incubação das amostras, a 60°C , por 3 horas, reage com os grupos cetônicos do ADA, em condições ácidas, para formar um derivado osazona avermelhado. A interferência de açúcares nesta etapa pode ser evitada por meio a incubação a 15°C ou da leitura após 75 minutos da adição do ácido sulfúrico 90% (RAHMAN *et al.*, 2007).

Já os métodos de análise de vitamina C total em CLAE fundamentam-se na extração do AA e do ADA em solução ácida (ácido metafosfórico, ácido metafosfórico com ácido acético glacial, ácido tricloroacético ácido cítrico, ácido cítrico com ácido acético glacial, ácido sulfúrico ou ácido fosfórico). Um agente redutor (ditiotretitol – DTT, dimercaptopropanol, cisteína ou homocisteína) é usado para converter o ADA em AA para

a posterior análise (ODRIOZOLA-SERRANO *et al.*, 2007). Opcionalmente, agente oxidante (DCPIP, Norit) ou tratamento enzimático é aplicado para a conversão do AA em ADA, forma na qual também se detecta a vitamina C por CLAE. Agentes quelantes (EDTA, ácido metafosfórico, decilamina) são usados para eliminação de interferentes durante o preparo da amostra. A coluna mais usada é a de fase reversa C18 ou de poliestireno vinil benzeno.

Kall & Andersen (1999) alegam que o ácido metafosfórico pode causar interações analíticas sérias com colunas de sílica, afetando a linha de base e os tempos de retenção. Recomenda-se a utilização da coluna de poliestireno divinil benzeno, caso o ácido metafosfórico seja o solvente de extração.

Odrizola-Serrano *et al.* (2007) avaliaram a confiabilidade de diferentes condições cromatográficas na análise de vitamina C total, AA e ADA. A extração foi feita com ácido metafosfórico 4,5% para quantificação de AA, e com DTT ou mercaptopropanol para quantificação total da vitamina C. O ADA foi determinado por diferença. Segundo os autores, a utilização de uma coluna C18, do agente redutor DTT no procedimento de extração, da fase móvel de ácido sulfúrico ajustada para pH 2,6 e do detector UV com absorvância em 245nm pode ser considerada a condição analítica mais satisfatória.

Fontanaz *et al.* (2006) estudaram um método cromatográfico que pudesse quantificar os ácidos ascórbico, deidroascórbico e isoascórbico ou eritórbico, tendo em vista que este último é muito aplicado como antioxidante pela indústria de alimentos, mas apresenta baixa atividade antiescorbútica (5%), cabendo diferenciá-lo das duas outras formas presentes no alimento. O método estabelecido é baseado na extração ácida do AA na presença do agente redutor Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP). A separação foi conduzida em coluna C-18, com eluente acetato de sódio (pH 5,4), contendo TCEP e decilamina como agente complexante de metais. O detector UV foi ajustado em 265nm.

Dado que cada amostra apresenta características e propriedades específicas em termos de extração, purificação e presença de interferentes (pigmentos, agentes oxidantes e redutores, entre outros), todos os métodos possuem alguma limitação para diferentes aplicações e matrizes. Quando a especificação das diferentes formas da vitamina C for relevante para o trabalho, o método por CLAE é indispensável. Em trabalhos que avaliaram vitamina C total em morango, observa-se a utilização das técnicas espectrofotométrica (SHIN *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 1995) e cromatográfica

(SHIN *et al.*, 2008; PINTO *et al.*, 2008; ALLENDE *et al.*, 2007; HAKALA *et al.*, 2003; CORDENUNSI *et al.*, 2003; 2002).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO-TRANSMISSÍVEIS (DCNT)

De acordo com Sies (2000), o estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros, podendo levar a danos. Sob circunstâncias normais, existe um equilíbrio entre a geração de radicais livres (ou sua concentração) e sua remoção pelos antioxidantes (incluindo a habilidade das células de reparar danos oxidativos).

Radicais livres são moléculas muito reativas que apresentam um elétron desemparelhado. São produzidos continuamente nas células, como subprodutos do metabolismo ou por liberação na respiração mitocondrial. Espécie Reativa de Oxigênio (ERO) é o nome genérico dado a uma variedade de moléculas e radicais livres derivados do oxigênio. A redução do oxigênio produz intermediários relativamente estáveis. Uma eletrorredução produz o ânion superóxido, precursor da maioria das ERO (COVARRUBIAS *et al.*, 2008). Entre as ERO podem ser citados o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o hidroxil ($OH\cdot$), o peroxil ($RO_2\cdot$), o alcoxil ($RO\cdot$), o hidroperoxil ($HO_2\cdot$), além espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HOCl), o ozônio (O_3), o oxigênio singlete (1O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (DALLE-DONE *et al.*, 2003).

Podem ocorrer desequilíbrios na geração de ERO e deficiências no sistema biológico para controlá-los podem resultar na condição de estresse oxidativo. Uma pequena flutuação na concentração de ERO pode ser suficiente para induzir uma sinalização intracelular (DRODGE, 2001). Entretanto, aumentos descontrolados nas concentrações dos oxidantes levam a uma reação em cadeia, mediada pelos radicais livres, que atacam, indiscriminadamente, proteínas (STADTMAN & LEVINE, 2003), lipídios (RUBBO *et al.*, 1994) e ácido deoxirribonucléico (DNA) (RICHTER *et al.*, 1988; LEDOUX *et al.*, 1999) o que compromete as funções biológicas normais (VATTEN & SHETTY, 2005).

Muitas condições patológicas e doenças estão associadas a um aumento na geração de radicais livres ou na redução da capacidade antioxidante, podendo atuar as duas condições. Mateos *et al.* (2005) relatam que a citotoxicidade e a peroxidação lipídica

mediada estão associadas ao envelhecimento celular e a DCNT. O estresse oxidativo pode causar dano em todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios. O alvo principal do estresse oxidativo pode variar, dependendo da célula, do tipo de exposição e da severidade do estresse (FRIDOVICH, 1998). Portanto, o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é o limiar entre a saúde e DCNT e outras condições patológicas, como doenças neurológicas, inflamações, aterosclerose, carcinogênese e diabetes (BÜYÜKBALCI & NEHIR EL, 2008; HALLIWELL, 2007; RAHMAN *et al.*, 2006; VATTEN & SHETTY, 2005).

A oxidação de proteínas pode acarretar danos aos receptores, enzimas, transdução de sinais, transporte de proteínas e de enzimas, além de danos em outras biomoléculas. Adicionalmente, pode ativar o sistema imune, induzindo a formação de anticorpos e doenças auto-imunes (GALLOWAY & HANDY, 2003; VICTOR & DE LA FUENTE, 2003). Grupos carbonila (aldeídos e cetonas) são formados nas cadeias laterais de proteínas (especialmente prolina, arginina, lisina e treonina) quando são oxidados (DALLE-DONE *et al.*, 2003). Essa estrutura é estável, o que torna sua detecção útil como biomarcador do estresse oxidativo.

O dano em enzimas reparadoras do DNA (endonucleases, ligases, etc) pode elevar os níveis de dano oxidativo no DNA e aumentar a frequência de mutações. De acordo com Halliwell & Gutteridge (1989), pode ainda ocorrer o dano nas proteínas envolvidas na manutenção essencial do gradiente iônico entre os fluídos extracelulares, tais como o Ca^{2+} -ATPase e $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$.

Zwart *et al.* (1999) relatam que o aumento de proteínas do grupo carbonil está associado a numerosos distúrbios patológicos, incluindo artrite reumatoide, doença de Alzheimer, síndrome do distúrbio respiratório, doença de Parkinson e aterosclerose.

Espécies reativas do oxigênio, formadas no metabolismo celular, produzem lesões no DNA e em outras estruturas celulares, fenômeno causador de doenças e provavelmente relacionado com o processo de envelhecimento celular. Um dos alvos importantes para o evento da senescência é o DNA, que, ao acumular lesões, desempenha menos eficientemente sua função informativa, levando eventualmente à degenerescência celular (FRIDOVICH, 1998). Há evidências de que as ERO estejam envolvidas no desenvolvimento do câncer, não somente por efeitos diretos no DNA, mas também na alteração de sinais de transdução, proliferação celular, morte celular e

comunicação intercelular. O dano pode ser direto, por meio de ataque químico ao DNA, nas bases purina e pirimidina ou na desoxirribose (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

As células possuem mecanismos de reparo ao dano no DNA, que podem não ser suficientes, na presença de excesso de radicais livres. O estresse oxidativo pode ocasionar uma quebra na estrutura de elementos do DNA, modificando as bases e gerando efeitos mutagênicos (BECKMAN & AMES, 1997). Um dos biomarcadores do dano em DNA mais avaliados é a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), a qual é formada pela hidroxilação do C-8 da guanina (SINGH *et al.*, 2003).

As doenças cardiovasculares são atualmente a principal causa de morte em todo o mundo (WHO, 2008). Está bem estabelecido, atualmente, que o estresse oxidativo vascular está associado a diversas doenças cardiovasculares, tais como doença arterial coronariana, hipertensão, infarto do miocárdio e diabetes *mellitus* não dependente de insulina (KOJDA & HARRISON, 1999). De acordo com Muller *et al.*, (2004) a hipercolesterolemia promove a aterosclerose e é um relevante fator de risco para síndromes coronarianas agudas e morte cardiovascular. Sua patogênese é multifatorial e inclui inflamação vascular e aumento da geração de superóxido vascular, além de outros radicais livres, como peroxinitrito, radicais hidroxis e peróxido de hidrogênio (KOJDA & HARRISON, 1999).

Uma das maiores conseqüências do aumento da disponibilidade de superóxido é o comprometimento da função endotelial vascular. Ohara *et al.* (1993) demonstraram o envolvimento do superóxido na disfunção endotelial induzida, em coelhos hipercolesterolêmicos. São muitos os mecanismos envolvidos com essa associação, dentre os quais podem ser citados o aumento da expressão e a atividade de enzimas geradoras de radicais oxigenados, como a NADPH-oxidase, a redução da expressão e atividade de enzimas como superóxido dismutase, que detoxifica espécies reativas de oxigênio, e redução da concentração de antioxidantes celulares, como cisteína e glutatona (CAI & HARRISON, 2000). Paralelamente, o estresse oxidativo reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico nos vasos, o que inicia uma disfunção endotelial (LANDMESSER *et al.*, 2000).

1.2.1 Potencial antioxidante dos compostos fenólicos e da vitamina C

Halliwell & Gutteridge (1989) definem antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, em comparação com aquela do substrato oxidável, inibe ou retarda significativamente a oxidação daquele substrato. Essa definição inclui compostos enzimáticos e não enzimáticos. Antioxidantes neutralizam radicais livres por meio da doação de um de seus próprios elétrons, finalizando as reações de captura de elétrons dos radicais livres. Os antioxidantes não se tornam, desta forma, radicais livres, porque são estáveis em quaisquer das formas (KAUR & KAPOOR, 2001).

1.2.1.1 Potencial antioxidante de compostos fenólicos

Polifenóis podem prover proteção contra radicais livres e espécies eletrofílicas em vários sistemas celulares. Também exibem efeitos citostáticos e citotóxicos em tumorigênese, sendo alguns capazes de inibir a invasão de células altamente metastáticas (HERMES-LIMA, 2004; ANTOLOVICH *et al.*, 2000). Também inibem a atividade de diversas enzimas, incluindo as lipoxigenases, ciclooxigenases, monooxigenases, collagenases, xantina oxidase e proteína quinases e aumentam a atividade de enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase. Adicionalmente, podem melhorar respostas anti-inflamatórias e reduzir a agregação plaquetária (MINK *et al.*, 2007). Flavonoides podem, ainda, inibir ou impedir a formação de radical hidroxil, pela reação de Fenton (FENTON, 1984), dependendo do potencial redox do antioxidante e dos íons metálicos envolvidos na oxidação. A maioria dos polifenóis quelar metais. Ácido tânico pode quelar Fe^{+2} e impedir sua reação com H_2O_2 . Segundo Antolovich *et al.* (2000) compostos fenólicos também inibem a nitrosação e possuem alta reatividade autoxidativa.

Foi reportado que o ácido elágico apresenta diversos efeitos farmacológicos, como anticarcinogênico, antibacteriano e anti-inflamatório. Thulstrup *et al.* (1999) demonstraram que esse composto fenólico aumenta a expressão dos genes protetores p53 e p21, promove a parada do ciclo celular na fase G1, desencadeando a apoptose das células cancerosas *in vitro*. Também pode inibir diferentes tipos de enzimas que modificam o DNA, como as topoisomerasas I e II, a girase e a polimerase, assim inibindo o crescimento das células cancerosas. O ácido elágico atua na quebra da cadeia de

reações de peroxidação, pela estabilização dos radicais peroxis, terminando, dessa forma, com as reações de propagação (GIL *et al.*, 2000).

Antocianinas são potentes antioxidantes, chegando a superar antioxidantes alimentícios clássicos, como hidroxibutil anisol (BHA), hidroxibutil tolueno (BHT) e tocoferol (FUKUMOTO & MAZZA, 2000; WANG *et al.*, 1997). A glicosilação de uma antocianina reduz sua capacidade antioxidante, já que diminui a habilidade da antocianina de deslocar elétrons. Andriambelason *et al.* (1998) reportaram que apenas as frações antociânicas e de taninos condensados do vinho tinto apresentaram atividade vasorrelaxante comparável aos polifenóis totais da bebida. Já os derivados de ácidos p-hidroxibenzoicos e p-hidroxicinâmicos e os flavonóis não exibiram a mesma atividade.

Schramm & German (1998) revisaram os mecanismos pelos quais compostos flavonoides podem exercer efeito inibitório no desenvolvimento de doenças cardiovasculares em seres humanos. Os flavonoides agem na inibição da autoxidação de monossacarídeos, da glicação de grupos amina livres de proteínas e posterior glicosilação de proteínas, e na inibição da replicação viral e bacteriana, reduzindo, assim, os processos inflamatórios correlatos, na inibição da ativação de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios, bem como da adesão de leucócitos e diapedese, na inibição da formação de células espumosas e proliferação celular, na ligação a receptores de estrogênio, desempenhando funções protetoras semelhantes, tais como inibição da oxidação lipídica, da agregação plaquetária e da expressão de quemoquinas e moléculas de adesão e promoção da vasodilatação, além da inibição da ativação de proteases local e sistêmica, as quais promovem a instabilidade das placas ateroscleróticas e os danos aos miócitos (Figura 13).

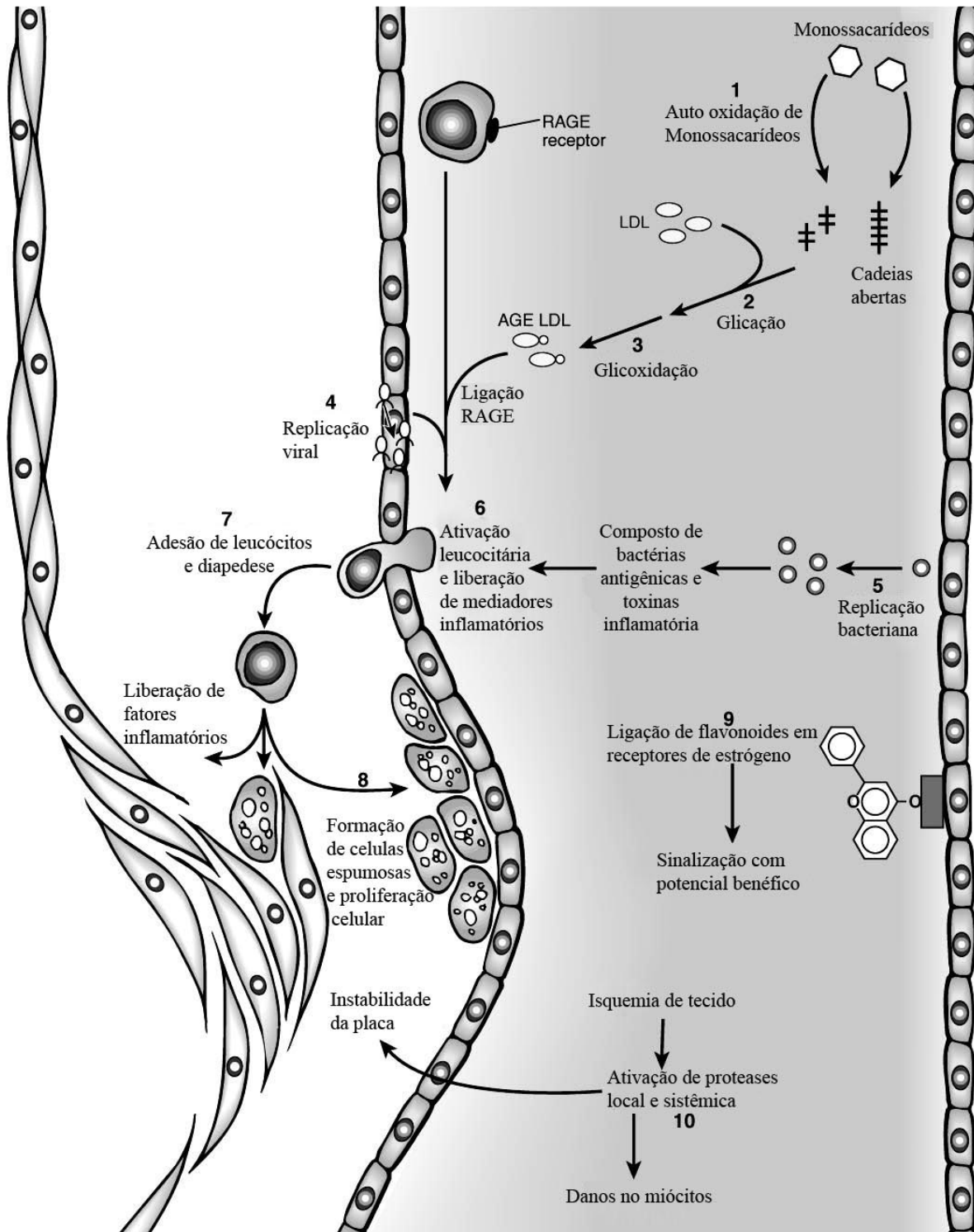


Figura 13 Ilustração dos eventos que os flavonoides poderiam bloquear ou inibir na formação de doenças cardiovasculares em humanos (SCHRAMM & GERMAN, 1998).

(1) autoxidação de monossacarídeos, (2) Glicação, (3) glicoxidação, (4) replicação viral, (5) replicação bacteriana, (6) ativação de leucócito e liberação de mediadores inflamatórios, (7) adesão de leucócitos e diapedese, (8) formação de células espumosas e proliferação celular, (9) ligação do receptor de estrogênio, (10) ativação de protease local e sistêmica.

A indução da apoptose em pré-adipócitos por flavonoides foi demonstrada e associada a atividade antioxidante (HSU & YEN, 2006). Foi demonstrado que a quercetina pode induzir a apoptose em preadipócitos 3T3-L1 via redução do potencial de membrana das mitocôndrias, regulando a redução da poli-(ADP-ribose) polimerase e da expressão do gene Bcl-2 (bloqueador da apoptose) e ativando a caspase 3, as enzimas Bax e Bak. Esses efeitos observados permitem associar alguns flavonoides à prevenção e ao auxílio ao tratamento da obesidade.

Obesidade, idade e sedentarismo são fatores comumente associados ao desenvolvimento do diabetes tipo 2. Outro fator de risco importante são os baixos níveis de atividade antioxidante no plasma (FACCHINI *et al.*, 2000).

Os benefícios dos compostos fenólicos têm sido investigados intensamente em células e tecidos *in vitro* e em modelos de cobaias animais, documentando suas propriedades antioxidantes e sua participação na prevenção de diversas doenças. No que se referem às doenças cardiovasculares e à obesidade e algumas patologias relacionadas, estudos com chá preto, vinho tinto, frutas vermelhas ou seus extratos de compostos fenólicos foram realizados nos últimos anos, com resultados diversos (Tabela 1).

Tabela 1. Estudos para avaliação do potencial antioxidante in vivo de compostos fenólicos

Alimento, bebida ou compostos isolado	Composto analisado (s)	Caracterização da amostra	Biomarcadores	Resultados significativos	Referencia
Pós de morango e de mirtilo liofilizados e extratos de antocianinas	Antocianinas	A) 4 grupos de 12 ratos, por 91-94 dias. B) 6 grupos de 9 ratos, por 70 dias.	Composição corporal Teste de tolerância à glicose	Ganho de massa e gordura em ratos alimentados com mirtilo. Linha de base da glicose plasmática mais baixa em ratos alimentados com morango. Redução da obesidade em ratos alimentados com antocianinas purificadas	Prior <i>et al.</i> , (2008)
Morangos ou aveia	Não houve	2 grupos de 14 sujeitos hipercolesterolêmicos, por 30 dias.	Colesterol total, Triglicerídeos, HDL, MDA*.	Redução do dano oxidativo a LDL. Redução da LDL e da razão Colesterol total/HDL.	Jenkins <i>et al.</i> , 2008.

*concentração de malondialdeído¹

¹ Biomarcador de oxidação lipídica

Tabela 1. Estudos para avaliação do potencial antioxidante in vivo de compostos fenólicos (cont.)

Alimento, bebida ou compostos isolado	Composto analisado (s)	Caracterização da amostra	Biomarcadores	Resultados significativos	Referencia
<i>Berries</i> (2 porções/dia) Mirtilo, néctar de <i>mirtilo vermelho</i> , cassis, purê de morango, sucos de <i>arônia</i> e <i>framboesa</i> .	Antocianinas, elagitaninos, ácidos fenólicos, flavonóis	72 sujeitos de meia-idade com fatores de risco de DCV*, por 8 semanas.	Função plaquetária, pressão sanguínea, colesterol total sérico, triglicérides	Inibição da função plaquetária, aumento da HDL, redução da pressão arterial	Erlund <i>et al.</i> , (2008)
Oxicoco (750 mL de suco de oxicoco por dia)	Antocianinas, fenóis totais, catequinas,	2 grupos de 10 mulheres 18-40 anos, por 15 dias	Compostos fenólicos no plasma, vitamina C, glutatona reduzida, homocisteína, atividade antioxidante. Colesterol plasmático, triglicérides. Superóxido dismutase, glutatona peroxidase, catalase nos eritrócitos. MDA** e 8-HDG*** na urina.	Aumento da vitamina C no plasma no grupo tratado com suco.	Duthie <i>et al.</i> , (2006)

* Doenças cardiovasculares; ** concentração de malondialdeído; *** concentração de 8-hidroxi-guanosina²

² Biomarcador de dano oxidativo no DNA

Tabela 1. Estudos para avaliação do potencial antioxidante in vivo de compostos fenólicos (cont.)

Alimento, bebida ou compostos isolado	Composto analisado (s)	Caracterização da amostra	Biomarcadores	Resultados significativos	Referencia
Ácido elágico	Ácido elágico ou probucol (droga) – 1%	4 Grupos de 6 ratos e hipercolesterolêmicos, por 8 semanas	Lipídios plasmáticos, lesões ateroscleróticas na aorta, TBARS*, 8-hidroxi guanosina -8-HDG**, caspase-8, caspase-9 e Fas-ligand	Redução das concentrações de lipídios plasmáticos, de TBARS e das lesões ateroscleróticas, supressão de 8-HDG, caspase 8, caspase-9 e Faz-ligand nos grupos tratados com ácido elágico e probucol.	Yu <i>et al.</i> , (2005)
Ácidos hidroxicinâmicos e vinho tinto	Ácido cafeico, sinápico, clorogênico ou extrato de vinho tinto	5 grupos de 8 hamsters, 12 semanas.	Colesterol plasmático, APO-A1***, APO-B****, atividade antioxidante do plasma, área com placas de gordura na aorta (APGA), atividade de superóxido dismutase no fígado e da glutathione peroxidase	Extrato de vinho tinto: redução do colesterol plasmático, da APO-B, da atividade de superóxido dismutase e aumento da atividade de glutathione peroxidase e da atividade antioxidante total (AAT). Ácidos hidroxicinâmicos: aumento da AAT.	Auger <i>et al.</i> , (2004)

*Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; **8-hidroxi guanosina; ***apolipoproteína A; ****apolipoproteína B

Tabela 1. Estudos para avaliação do potencial antioxidante in vivo de compostos fenólicos (cont.)

Alimento, bebida ou compostos isolado	Composto analisado (s)	Caracterização da amostra	Biomarcadores	Resultados significativos	Referencia
Chá preto e suplementação de antioxidantes (vitaminas C e E, e betacaroteno)	(vitaminas C-0,05% e E-0,1%, e betacaroteno-0,5%) Chá preto (50g de folhas em 4L de água)	3 grupos de 20 ratos por 8 semanas	Colesterol plasmático, LDL oxidada, área da placa de gordura na aorta (APGA)	Antioxidantes: redução de LDL oxidada e da APGA.	Crawford <i>et al.</i> , 1998

Crawford *et al.* (1998) determinaram os efeitos da suplementação da dieta com extrato de chá preto (rico em fenólicos) e de uma mistura de antioxidantes (0,1% de vitamina E, 0,5% de betacaroteno e 0,05% de vitamina C), na oxidação de LDL e em lesões ateroscleróticas de ratos hipercolesterolêmicos. A oxidação das LDL, medida como fase lag da formação de dienos, foi significativamente inibida no grupo tratado com antioxidantes, quando comparado com grupo tratado com chá preto ou controle. A área superficial da seção transversal das lesões ateroscleróticas reduziu-se em 60%, nos ratos que receberam antioxidantes, em relação aos demais ratos, não sendo observada diferença entre os grupos controle e tratado com chá preto.

Auger *et al.* (2004) avaliaram o efeito protetor dos ácidos cafeico, sinápico, clorogênico e do extrato fenólico de vinho tinto (EFVT) na modulação da aterogênese em hamsters hipercolesterolêmicos, tratados por 12 semanas. Os autores relataram concentração 22% menor de lipoproteínas plasmáticas, no grupo tratado com EFVT e nenhuma diferença significativa para grupos tratados com os ácidos cinâmicos, isolados em relação ao grupo controle. A atividade de superóxido dismutase no fígado foi 33% mais baixa e a de glutathione peroxidase 67% mais elevada, em hamsters que receberam EFVT, não se observando diferença significativa entre os demais grupos. Todos os componentes fenólicos aumentaram a atividade antioxidante no plasma (em média 28%) em comparação aos controles. Finalmente, observou-se área de lesão aterosclerótica 30% menor no grupo EFVT, em comparação aos demais.

Yu *et al.* (2005) estudaram o efeito da adição de ácido elágico ou de probucol, uma droga antioxidante e hipocolesterolemiantes, na dieta de coelhos normo e hiperlipidêmicos, por 8 semanas. Observou-se um aumento dos lipídios plasmáticos, das ERO e de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), no grupo hipercolesterolêmico. Todavia, decréscimo nos mesmos biomarcadores foi verificado nos grupos tratados com probucol ou com ácido elágico. A extensão da aorta torácica coberta com lesões ateroscleróticas foi de 45% no grupo hiperlipidêmico e de 2-3% nos grupos tratados. Os níveis de 8-hidroxi-guanosina e a expressão de caspase-8, caspase-9 e *Fas ligand* (biomarcadores da apoptose celular em lesões ateroscleróticas) na aorta foram suprimidos no grupo tratado com ácido elágico. Os resultados indicaram que o

ácido elágico pode prevenir a aterosclerose, via supressão do estresse oxidativo e da apoptose em coelhos hiperlipidêmicos.

Yeomans *et al.* (2005) buscaram estabelecer as interações dinâmicas entre quercetina, ácido cafeico e estruturas correlatas, ácido ascórbico e tocoferol, na habilidade de interação com íons cobre e conseqüente prevenção do estresse oxidativo, no plasma coletado de voluntários não fumantes. Foi verificada menor atividade antioxidante para tocoferol e ácido ascórbico, comparados aos compostos fenólicos em concentrações equimolares. Quercetina foi o fenólico mais efetivo nos sistemas avaliados, tendo exibido maior fase lag na formação de dienos conjugados e menor concentração de carbonil. Uma prolongação significativa da fase lag foi observada nas combinações de ácido ascórbico e quercetina, ácido ascórbico e epicatequina, epicatequina e ácido cafeico e quercetina e epicatequina, quando comparados aos efeitos individuais somados. O maior efeito inibitório da oxidação proteica em LDL foi observado na combinação quercetina e ácido cafeico, também mais elevada que a soma dos efeitos dos mesmos compostos quando isolados.

Duthie *et al.* (2006) investigaram se o consumo de 750 mL de suco de *cranberry* (oxicoco) por dia durante duas semanas, poderia alterar a atividade antioxidante no plasma e biomarcadores do estresse oxidativo, relacionados a doenças cardiovasculares e câncer em pessoas saudáveis. Os autores concluíram que a suplementação com o suco por período curto de tempo não influenciou os biomarcadores avaliados.

Erlund *et al.* (2008) avaliaram o efeito do consumo de frutas vermelhas (100g de mirtilos, néctar com 50g de mirtilos vermelhos, diariamente, e 100g de purê de morango, ou cassis, ou 70mL suco com 80% de arônia ou framboesa, em dias alternados) por oito semanas, nas funções hemostáticas, nas concentrações de lipoproteínas no soro e na pressão arterial de indivíduos com fatores de riscos associados a doenças cardiovasculares, e observaram redução significativa de agregação plaquetária e da pressão sanguínea sistólica, aumento significativo das concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e de polifenóis plasmáticos, nos indivíduos que consumiram as frutas vermelhas. Não houve alteração significativa nas concentrações de lipoproteínas totais e de triglicerídeos.

Prior *et al.* (2008) avaliaram ratos alimentados por dietas com alta ou baixa densidade calórica por 92 (experimento 1) ou 70 dias (experimento 2), com ou sem pós liofilizados de mirtilos ou morangos. A composição corpórea e a linha de base da glicose plasmática foram determinadas. A adição das frutas vermelhas em uma dieta de baixa densidade calórica não afetou o ganho de peso, o peso final, o percentual de gordura e a ingestão de proteínas ou calorias. Em animais que receberam a dieta com 45% de gordura mais mirtilo, os valores dessas variáveis foram mais elevados em comparação a seu grupo similar que não recebeu mirtilo em pó. Essa alteração não foi ocasionada em grupos com dieta de alta densidade calórica com adição de pó de morango. A adição de mirtilo ou de morango à dieta não afetou o grau de tolerância à glicose nos animais. A linha de base da glicose plasmática era mais baixa em grupos com dieta hiperlipidêmica que receberam morangos, em relação a seu grupo controle. Após 8 semanas, ratos alimentados com uma dieta com 60% de gordura mais antocianinas purificadas de mirtilo na água do bebedouro apresentaram ganho de peso corporal mais baixo do que os controles. A ingestão de antocianinas puras de mirtilo e de morango resultou em redução da obesidade.

Em um estudo com indivíduos hiperlipidêmicos, Jenkins *et al.* (2008) estudaram o efeito da adição de morangos como forma de melhorar os efeitos antioxidantes de uma dieta hipocolesterolemia, que incluía soja, fibra solúvel, fitoesteróis e nozes. Após a dieta de 2 anos e meio, os indivíduos receberam a suplementação com morangos (454 g/dia, 112 kcal) ou pão de farinha de aveia (65 g/dia, 112 kcal, ≈ 2 g β -glucanas, grupo controle) durante um mês, com acompanhamento posterior de 15 dias. A suplementação com morango resultou em maior redução do dano oxidativo às LDL. Ao final do período, as reduções nas LDL e na relação colesterol total / HDL foram mantidas por aproximadamente um ano e foram similares aos efeitos observados no grupo que recebeu o pão e farinha de aveia.

Parece que o efeito do consumo de polifenóis depende de outros fatores. Faz-se necessário considerar os tipos e concentrações de fenólicos presentes nos alimentos, os tipos de interação entre os fenólicos e outros antioxidantes presentes, a quantidade consumida e tempo de consumo ou

duração do tratamento e a interação com outros alimentos e até medicamentos.

Vale, ainda, destacar que os diferentes compostos fenólicos não apresentam o mesmo potencial antioxidante. A habilidade de os ácidos hidroxicinâmicos inibirem a oxidação de LDL de humanos decresceu na seguinte ordem: ácido cafeico > ácido sinápico > ácido ferúlico > ácido p-cumárico (STEINBERG *et al.*, 1989; MEYER *et al.*, 1998a, b; NATELLA *et al.*, 1999).

Vários autores estudaram a relação estrutura-atividade de flavonoides e reportaram algumas características importantes que influenciam essa atividade: (a) a presença de estrutura o-dihidroxi ou catecol no anel B, resultando em alta estabilidade do radical, auxiliando na deslocalização do elétron não pareado; (b) presença de grupo 3-hidroxi ligado à dupla ligação C2-C3 e adjacente à função 4-oxo no anel C, responsável pela deslocalização do anel B e (c) presença de grupos hidroxis nos carbonos 5 e 7 do anel A, junto com a função 4-oxo no anel C, resultando em máxima capacidade de combater e absorver radicais (PIETTA, 2000; RICE-EVANS *et al.*, 1996; COOK & SAMMAN, 1996; BORS *et al.*, 1990). A ausência ou substituição de algumas dessas características leva à redução ou perda da atividade antioxidante. Por exemplo, pelargonidina-3-glicosídeo, a antocianina mais abundante em morango, não possui nenhuma das características citadas. Adicionalmente, é reportado que a glicosilação dos compostos fenólicos reduz sua atividade quando comparados às respectivas formas aglicona (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992). O flavonol quercetina apresenta todas as características citadas acima e estudos relatam sua alta atividade antioxidante *in vitro* quando comparado com outros compostos fenólicos (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

1.2.1.2 Potencial antioxidante da vitamina C

A vitamina C participa da conversão do colesterol em ácidos biliares e no metabolismo iônico de minerais, estimula a absorção de ferro não-hêmico pelo intestino, por meio de sua redução, e modula os transportes de íons, bem como seu armazenamento (WINTERGERST *et al.*, 2006; HALLBERG & HULTHEN, 2000).

O papel do ácido ascórbico como agente redutor biológico pode ser ligado também à prevenção de DCNT. Supõe-se que a vitamina C faça parte da primeira linha de defesa do organismo (SILVA & COZZOLINO, 2007), protegendo as proteínas, os lipídios e o DNA da oxidação (WINTERGERST *et al.*, 2006).

O ácido ascórbico é o mais importante antioxidante solúvel em água e inibe a modificação oxidativa de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), não apenas diretamente, quando combate espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (PRICE *et al.*, 1999; RETSKY *et al.*, 1993), mas também por contribuir com o aumento dos antioxidantes tocoferol e glutatona nas membranas celulares (WINTERGERST *et al.*, 2006; PRICE *et al.*, 1999; WEN *et al.*, 1997).

LDL oxidada é o constituinte primário das lesões ateroscleróticas e, pela inibição de sua formação, antioxidantes em geral exercem papel fundamental na prevenção de doença cardiovascular aterosclerótica. Entretanto, o efeito protetor da vitamina C também está relacionado a outras atividades que desempenha nos organismos (PRICE *et al.*, 1999). Na Tabela 2 são mostrados os diversos mecanismos pelos quais a vitamina C pode exercer efeito protetor nos processos aterogênicos.

Tabela 2. Mecanismos pelos quais a Vitamina C pode inibir a aterosclerose

<i>Função da vitamina C</i>	<i>Mecanismo</i>	<i>Efeito na aterogênese</i>
Antioxidante	Inibição da oxidação de LDL colesterol	Redução da formação de células espumosas
Anti-histamínica	Redução da permeabilidade vascular	Redução do acúmulo subendotelial de LDL colesterol
Produção de colágeno	Redução da permeabilidade vascular	Redução do acúmulo subendotelial de LDL colesterol
Regulação de mRNA	Aumento da concentração de HDL colesterol	Perfil favorável de lipoproteínas
Redução de infecções	Redução de fatores hemostáticos	Redução de trombose
Anti-inflamatória	Redução da aderência de monócitos ao endotélio Redução de proteínas de fase aguda	Redução do processo inflamatório (fator de risco para doenças cardiovasculares)

Fonte: Price *et al.*, (2001).

A função da vitamina C como doadora de elétrons envolve as atividades monoxigenase ou dioxigenase em algumas enzimas importantes, como a dopamina hidrolase (envolvida na biossíntese de catecolaminas, epinefrina e norepinefrina), a peptidil-glicina monoxigenase (amidação de peptídeos hormonais) e está, ainda, envolvida no metabolismo de tirosina (4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase) (CARR & FREI, 1999).

Adicionalmente, a vitamina C atua como cofator de hidrolases e metaloenzimas que atuam em reações de oxido-redução. Prolina e lisina hidroxilase catalisam a hidroxilação postranslacional das ligações peptídicas de prolina e resíduos de lisina, o que é essencial para a funcionalidade do colágeno na sua estrutura de tripla hélice e, conseqüentemente, para os processos de cicatrização (WINTERGERST *et al.*, 2006; WALMSLEY *et al.*,

1999). Ademais, sua função como agente redutor para oxidases de múltiplas funções tem grande importância no metabolismo de medicamentos nos microsossomos. Uma deficiência de vitamina C pode, portanto, acarretar a redução da atividade dessas oxidases, além da redução do transporte de elétrons no citocromo P-450 (CARR & FREI, 1999). Brennan *et al.* (2000) relataram que a vitamina C apresenta efeito protetor dos neutrófilos contra as ERO geradas durante a fagocitose, prevenindo danos oxidativos endógenos ao DNA.

1.2.2 Métodos para avaliação do potencial antioxidante dos alimentos

1.2.2.1 Métodos para avaliação do potencial antioxidante *in vitro*

O potencial antioxidante de frutas e hortaliças pode ser medido *in vitro* por diversos métodos. Não há um método que consiga avaliar satisfatoriamente a atividade antioxidante total de uma amostra, já que existem diversos mecanismos antioxidantes (VEDANA, 2008; OU *et al.*, 2002), como o seqüestro de radicais, a habilidade redutora, a complexação de íons metálicos, entre outros. Há dificuldades na comparação dos métodos, por causa da complexidade e princípios diferentes das reações. Alguns métodos antioxidantes produzem resultados diferentes ou mesmo contraditórios, tornando-se impossível qualquer comparação entre eles (VEDANA, 2008; ALONSO *et al.*, 2002). Ao se analisar o potencial antioxidante *in vitro* de um alimento, recomenda-se a aplicação de mais de um método (CAPOCASA *et al.*, 2008; ARUOMA, 2003).

Segundo Rufino *et al.* (2006), os métodos empregados para análise *in vitro* podem ser baseados na captura do radical peroxila (“Oxygen Radical Absorbancy Capacity” – Capacidade de absorbância do radical oxigênio – ORAC); “Total Radical - Trapping Antioxidant Parameter” - Parâmetro antioxidante relacionado à captura total de radicais - TRAP); poder de redução do metal (“Ferric-Reducing Antioxidant Power” – Habilidade antioxidante de reduzir o sal férrico - FRAP; “Cupric-Reducing Antioxidant Power” – Habilidade antioxidante de reduzir o sal cúprico CUPRAC); captura do radical hidroxila (método de desoxirribose); captura do radical orgânico (2,2-Azinobis-(3-

etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio- ABTS ou 2,2-difenil-1-picrilhidrazil - DPPH), ou quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (“Thiobarbituric Reactive Substances” – Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico - TBARS, oxidação do LDL ou co-oxidação do betacaroteno/ácido linoleico). Dentre estes métodos, FRAP, DPPH e sistema betacaroteno/ácido linoleico estão entre os mais utilizados para avaliação de frutas e hortaliças.

1.2.2.1.1 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

De acordo com Borguini (2006), o método do DPPH utiliza o radical livre DPPH·, solúvel em metanol, disponível comercialmente. O grau de descoloração do radical DPPH·, após receber um elétron de um composto fenólico, é medido espectrofotometricamente a 517nm, em uma solução metanólica, até a absorbância permanecer constante e indicar a eficiência do antioxidante adicionado em remover o radical.

O DPPH pode ser mantido indefinidamente com pouca decomposição porque não reage com o oxigênio. O método provou ser bastante útil em uma série de investigações, tais como a determinação das propriedades antioxidantes de amins, fenóis, vitaminas, extratos vegetais, medicamentos e para inibir reações hemolíticas (VEDANA, 2008).

1.2.2.1.2 Cooxidação do Sistema betacaroteno/ácido linoleico

De acordo com Kekrer (1993), a mensuração da atividade antioxidante pelo método betacaroteno baseia-se na perda da cor amarela deste pigmento, em função da reação com os radicais formados pela oxidação do ácido linoleico numa emulsão. O descoloramento do betacaroteno, medido pelo decréscimo da absorbância inicial a 470nm, é mais lento na presença de um antioxidante. Entre as principais limitações do método, Kekrer (1993) cita o fato de as reações ocorrerem em uma emulsão, o que confere diferença de contato entre antioxidantes solúveis em água ou em óleo e o ácido linoleico. Além disso, a presença de sais nos extratos pode, em alguns casos, fazer com que os flavonoides apresentem comportamento pró-oxidante.

1.2.2.1.3 FRAP (Ferric-reducing Antioxidant Power)

Pulido *et al.* (2000) descrevem o método FRAP como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos, soluções aquosas de compostos puros e extratos de alimentos. O método testa a força antioxidante do extrato, por meio da avaliação da redução do complexo ferritripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$, M.M. 312,33 g/mol] a ferroso-tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) por redutores, no caso, os antioxidantes da fruta, em pH baixo. Baseia-se no fato de que a habilidade de um composto em produzir Fe^{2+} a partir de Fe^{3+} define sua força antioxidante (VASCONCELOS *et al.*, 2007). O complexo Fe^{2+} -TPTZ tem uma cor azul intensa e pode ser monitorado a 593 nm, em espectrofotômetro.

A limitação do método reside no fato de que nem todo redutor que é hábil para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} é antioxidante; nem todo antioxidante tem a habilidade específica para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , como por ex., a glutatona. O resultado final pode ser convertido a mmol de equivalentes de trolox por kg de fruta. A atividade relativa do trolox em FRAP é de 2,0 mmol/L, ou seja, a reação direta de Fe^{2+} proporciona uma mudança de absorvância, que é a metade de 1 equivalente molar para o trolox (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Opcionalmente, o resultado pode ser expresso em μM sulfato ferroso/g de fruta (RUFINO *et al.*, 2007).

Thaipong *et al.* (2006) estimaram a atividade antioxidante total de extratos obtidos de frutos de goiaba, pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC, e verificaram que FRAP foi a técnica mais reprodutível e aquela que apresentou uma elevada correlação com os teores de ácido ascórbico e de grupos fenólicos.

1.3 MORANGO

1.3.1 Histórico e importância

O consumo de morangos é citado desde épocas remotas, conhecendo-se a fruta como "fragum" ou "fraga", por seu gosto doce. Há relatos da cultura do morangueiro das espécies *Fragaria vesca* e *F. moschata*, no século XV, na

França e Inglaterra. O aparecimento do híbrido *Fragaria x ananassa* ocorreu na Europa no século XVIII. Representantes octoploides *F. chiloensis* e *F. virginiana* foram levados das Américas do Sul e do Norte, respectivamente, e cultivadas próximas nas hortas e jardins europeus (SANHUEZA *et al.*, 2005). A polinização cruzada deu origem a híbridos que foram rapidamente reconhecidos por suas características morfológicas e sensoriais únicas, sendo, por isso, conduzidos ao cultivo em escala e ao melhoramento genético (DAVIS e DEHAAM, 2008). Atualmente, o morango é largamente consumido em todo o mundo, em sua forma *in natura* ou como ingrediente de produtos industrializados ou preparações alimentares (SEERAM *et al.*, 2006).

No Brasil houve, em meados do século XX, grande incentivo à produção de morangos, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo, onde a cultura alcançou grande desenvolvimento comercial. A partir dos anos 1960, trabalhos de pesquisa e melhoramento genético, desenvolvidos pelo Instituto Agrônomo de Campinas e pela EMBRAPA Clima Temperado, em coordenação com as diferentes Secretarias de Agricultura dos Estados, proporcionaram um grande incentivo para o desenvolvimento nacional da cultura em escala comercial, o que levou à introdução de cultivares mais adaptadas e a novas técnicas de cultivo, possibilitando ampliação das lavouras (AMARO, 2002).

O início do cultivo do morangueiro no Brasil, segundo Camargo e Passos (1993), não é bem conhecido. Entretanto, a cultura começou a expandir-se desde a década de 1960, com o lançamento do cultivar Campinas (PASSOS & TRANI, 1997). Desenvolveu-se em áreas dos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, Goiás, Santa Catarina, Espírito Santo e Distrito Federal, em regiões de solos e climas diversos.

Atualmente estima-se uma produção anual de 100.000 toneladas de morangos, cultivados numa área de aproximadamente 3.500 ha, sendo Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul, os maiores estados produtores de morango no Brasil (ANUÁRIO, 2006; AMARO, 2002; RESENDE, 1999).

A cultura de *Fragaria* sp. apresenta grande importância econômica na comercialização de frutas tanto para seu consumo *in natura* como para industrialização, destacando-se a produção de geleias, sorvetes, balas, sucos e iogurtes (SANTOS, 1993). De acordo com Moraes (2004), cerca de 70-80%

das 500 mil toneladas/ano de iogurtes consumidos no Brasil têm o sabor morango.

1.3.2 Classificação botânica e cultivo

O morangueiro, *Fragaria spp.*, é uma planta da Ordem *Rosales*, Família *Rosaceae*, subfamília *Rosideae*, tribo *Potentillae*, gênero *Fragaria L.*, (VIDAL & VIDAL, 2003; HUTCHINSON, 1978). Foi tipificado por Linneu, em 1753, e reúne um grupo de plantas muito variáveis, tanto do ponto de vista nutricional, como estrutural (HAMMER & PISTRICK, 2003; QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1996). Há mais de 20 espécies do gênero *Fragaria* com o nome comum de morangueiro, com ampla distribuição nas zonas temperadas e subtropicais, e que se distinguem pelo grau de poliploidia que exibem (DARROW, 1966). Algumas espécies são diploides, isto é, têm dois conjuntos dos sete cromossomas básicos (14 cromossomas no total); outras são tetraploides (quatro conjuntos, 28 cromossomas); hexaploides (seis conjuntos, 42 cromossomas); octoploides (oito conjuntos, 56 cromossomas), ou decaploides (dez conjuntos, 70 cromossomas). De modo geral, as espécies de morangueiro com mais cromossomas tendem a ser mais robustas e maiores, produzindo, também, em geral, frutos de maior tamanho.

A planta é herbácea, estolonífera, perene, com caule semi-subterrâneo, conhecido como coroa (caule modificado), que apresenta um tecido condutor periférico em espiral nos dois sentidos, unido às folhas. A medula é proeminente e muito suscetível às geadas. À medida que envelhece, a coroa pode originar de 8 a 10 novas coroas.

As folhas se originam da coroa em disposição helicoidal, com forma e cor variando conforme o cultivar. Em geral, são trifoliadas, com um par de estípulas triangulares na base. Às vezes, apresentam um par de pequenos folíolos abaixo dos normais. Os folíolos são dentados, de cor verde-escura na face superior e acinzentada e pilosa na inferior. As folhas têm entre 300 a 400 estômatos/mm², um número bem maior que os de outras culturas, como por exemplo, da macieira, que possui 246 estômatos/mm². Esta característica faz que a cultura seja muito sensível à falta de água, baixa umidade relativa, alta temperatura e intensidade e duração da luz (SANHUEZA *et al.*, 2005).

O morangueiro possui estolões ou caules que se desenvolvem a partir das gemas basais das folhas, crescem sobre a superfície do solo e têm a capacidade de emitir raízes e dar origem a novas plantas. O pedúnculo floral é ereto, curvando-se após a polinização. As flores são hermafroditas e hemicíclicas. O cálice é formado por brácteas unidas na base. As pétalas são livres, lobuladas, brancas ou avermelhadas, dispostas ao redor do receptáculo proeminente, o qual, após a fecundação dos pistilos, se transforma no "morango". O fruto, a parte comestível do morangueiro, carnosa, suculenta, de cor rosada ou vermelha, conhecida vulgarmente como "morango", envolve, de fato, os verdadeiros frutos, que são aqueles pequenos pontos amarelos ou avermelhados, diminutos, superficiais, denominados botanicamente de aquênios (LOPES, 2005).

As raízes originam-se das coroas na forma de um sistema fasciculado. Crescem, principalmente, nas épocas de dias curtos, com duração menor do que 12 horas de luz. No outono e no início do inverno, é necessário utilizar cobertura plástica para elevar a temperatura do solo, condição que favorece o crescimento radicular.

Segundo Sanhueza *et al.*, (2005), as espécies comercialmente importantes são as européias *Fragaria vesca* L.(diploide), *Fragaria moschata* Duch (hexaploide) e *Fragaria viridis* Duch (diploide); as americanas *Fragaria virginiana* Duch (octoploide) e *Fragaria chiloensis* L (octoploide); as híbridas *F. virginiana* x *F. chiloensis* = *F. ananassa* (octoploide) e as remontantes *F. ananassa* x *F. vesca*.

O morango é uma cultura praticada por pequenos produtores rurais, que usam mão-de-obra familiar, durante todo o seu ciclo, sendo a maior parte da produção destinada ao mercado *in natura*. Segundo Santos (2005), as principais cultivares plantadas no Brasil dividem-se em dois grupos, um para finalidades de indústria, outro para consumo *in natura*. As principais cultivares com destino à indústria são Santa Clara, Burlkey, Dover. Para consumo *in natura* são produzidas as cultivares Tangi, Campinas, Osogrande, Tudla, Selva e Seascape. Para dupla finalidade dispõe-se da cultivar Vila Nova. Anualmente, entretanto, diversos novos materiais são plantados e testados pelos produtores, que estão constantemente buscando maior produtividade, maior resistência às pragas e melhor desempenho sensorial de seus produtos.

A cultura responde de forma diferente às combinações de temperatura e de comprimento do dia. Assim, a formação de estolões e o desenvolvimento de folhas são favorecidos sob condições de dias longos e temperatura elevada, a indução floral ocorre com temperatura baixa e dias curtos e, a frutificação, em dias longos e temperaturas amenas (SANHUEZA *et al.*, 2005).

De acordo com a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER-DF, 2008), o município de Brazlândia responde por um terço do plantio total de frutas do Distrito Federal, sendo a fruticultura o principal motor econômico local. A região é responsável por 99% da produção de morangos do DF. Atualmente, o município é o sétimo maior produtor do país e o primeiro da região Centro-Oeste. A variedade 'Osogrande' é a predominante, por suas qualidades mais apropriadas ao transporte e comercialização, pois é exportado para o norte e nordeste do país. A área plantada é de 100 hectares, nos quais são gerados, no pico da safra, entre agosto e setembro, mais de 1000 empregos diretos, proporcionados por 120 produtores. No período da safra de maio a outubro, a produção chega a mais de 3.000 toneladas.

Uma das cultivares mais recentemente introduzidas no Brasil é a 'Camino Real', desenvolvida por pesquisadores da Universidade da Califórnia (EUA). Seus frutos são grandes, firmes, com epiderme e polpa vermelho-escura, de bom sabor, sendo recomendadas para mercado *in natura* e industrialização (SHAW & LARSON, 2002). Em vista do ingresso recente na cadeia produtiva brasileira, existem muito poucas informações sobre a produção e as características pós-colheita de morangos 'Camino Real' produzidos no Brasil, bem como de sua aptidão para o processamento industrial.

A definição do ponto de colheita do morango é uma das operações mais importantes do seu ciclo cultural, pois influencia diretamente na durabilidade de pós-colheita do morango. Os frutos do morangueiro são muito delicados e pouco resistentes, em virtude da epiderme delgada, grande percentagem de água e alto metabolismo, o que exige muitos cuidados durante a colheita. Colhidos muito maduros, poderão chegar ao mercado em decomposição e com podridões; colhidos ainda verdes, terão alta acidez, adstringência e ausência de aroma. Em ambos os casos, o produto chega ao mercado com baixo valor comercial (DIAS *et al.*, 2007).

A colheita começa aproximadamente aos 60/80 dias após o plantio das mudas, quando as plantas já possuem folhas e raízes suficientes para enchimento dos frutos (Figura 14). Dependendo das condições climáticas, do tipo de solo, dos tratamentos culturais, do método de produção de mudas e da cultivar, pode prolongar-se por 4 a 6 meses, em função do fotoperíodo e disponibilidade de água. A época de colheita varia de agosto a dezembro em regiões mais frias, como o Sul do Brasil (BALBINO, 2006). No Distrito Federal a safra corresponde aos meses de agosto a setembro, mas há disponibilidade de frutos durante todo o ano.



Figura 14 Lavoura de morango no início de colheita (FRUTÍCULA DOIS AMIGOS, Brazlândia-DF, 2008)

A colheita realiza-se de forma manual, no ponto de colheita "maduro" para fins industriais, e de $\frac{1}{2}$ maduro a $\frac{3}{4}$ maduro para comercialização *in natura*. A cor é o parâmetro mais importante para definir o ponto de colheita dos morangos. De modo geral, o fruto deve ter no mínimo 50% a 75% da superfície de cor vermelho-brilhante, quando destinado ao consumo fresco (Figura 15). O ponto de colheita pode variar em função da distância do tempo de transporte, da temperatura ambiente, da cultivar e da finalidade do produto (CANTILLANO, 2006).



Figura 15 Fases de maturação do morango (FRUTÍCULA DOIS AMIGOS, Brazlândia-DF, 2008)

1 - fruto formado e imaturo, 2 - fruto com 50% de maturação, 3 - fruto com 75% de maturação e 4 - fruto com 100% de maturação.

Dependendo das condições climáticas, a colheita pode ser realizada diariamente ou, no máximo, a cada três dias, para obter um ponto de maturação uniforme. Isso é importante, pois como o morango é um fruto de tipo "não-climatérico", não ocorre amadurecimento nem melhoram as características organolépticas após a colheita. Colhido verde, permanecerá como tal, sem que aconteça a melhoria de sua qualidade comestível (CANTILLANO, 2006).

1.3.3 Valor nutricional e presença de compostos bioativos

O consumo de morango exerce efeito antioxidante, antiinflamatório, anticarcinogênico e antineurodegenerativo (HANNUM, 2004). Estudos revelam que as substâncias relacionadas a essas propriedades são o ácido ascórbico, abundantemente presente na polpa, e os compostos fenólicos. Esses compostos são produtos do metabolismo dos fenilpropanoides. Os processos de injúrias e o conseqüente aumento na evolução do etileno induzem a atividade da fenilalanina amônia liase (FAL), que catalisa a biossíntese de fenilpropanoides nas plantas (DIXON & PAIVA, 1995).

O consumo do morango pode suprir a carência de minerais e vitaminas C e do Complexo B. Sanhueza *et al.* (2005) reportam em seu trabalho o valor nutricional médio de uma porção de 100g de morango (Tabela 3).

Tabela 3. Valor nutricional médio do morango *Fragaria ananassa* (em 100 g)

Informação Nutricional	Quantidade em 100g
Valor energético (kcal)	39,00
Glicídios (g)	7,40
Proteínas (g)	1,00
Lipídios (g)	0,60
Cálcio (mg)	22,00
Fósforo (mg)	0,90
Sódio (mg)	31,50
Potássio (mg)	155,20
Cobre (mg)	0,20
Enxofre (mg)	11,50
Zinco (mg)	0,23
Iodo (mg)	0,16
Vitamina A (µg)	3,00
Vitamina B1 (µg)	30,00
Vitamina B2 (µg)	0,40
Niacina (µg)	0,40
Vitamina C (mg)	72,80

Adaptado de: Sanhueza *et al.* (2005)

Na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos–TACO (NEPA/UNICAMP, 2004) é apresentada a composição de frutos da espécie *Fragaria vesca* L., em que se declara, entre outros componentes, o conteúdo de 64mg de vitamina C, 184mg de potássio, 1,7g de fibras alimentares e valor energético de 30kcal, por 100g de parte comestível.

Morangos são também fontes importantes de compostos fenólicos. De acordo com Hannum (2004), os principais fenólicos encontrados nos frutos são o ácido elágico e alguns flavonoides, como as antocianinas, a catequina, a quercetina e o kaempferol. Nas plantas, os compostos fenólicos atuam como componentes estruturais e pigmentantes, além de apresentarem atividade antioxidante (HANNUM, 2004; NATELLA *et al.*, 2002; RICE-EVANS *et al.*, 1996), antimicrobiana e antiviral (KHANDUJA *et al.*, 1999; KAUL & KANDHUJA, 1998, STRUBE *et al.*, 1993).

1.3.4 Principais compostos fenólicos em morangos e fontes de variação

A variação nos conteúdos de fenólicos dentro de uma espécie é, principalmente, função das diferenças entre variedades ou das condições edafoclimáticas. Além dessas, Häkkinen (2000) também aponta que diferenças

entre os métodos analíticos e nos estágios de maturação dos frutos avaliados também contribuem para as discrepâncias observadas nas publicações científicas. A variação dos teores de fenólicos em cultivares de morango foi reportada previamente por Stohr & Herrmann (1975). Uma variação de 90 a 402mg de ácido elágico.kg⁻¹MF de morango é reportada por Häkkinen (2000), para morangos em diferentes países nórdicos. Pinto *et al.* (2008) encontraram valores entre 249mg.kg⁻¹ a 490mg.kg⁻¹ de ácido elágico total, dependendo das condições de extração, para a cultivar Dover, e encontraram uma variação entre cultivares de 170mg.kg⁻¹ a 470mg.kg⁻¹, para a condição de extração selecionada pelos autores. Outros trabalhos indicaram grandes diferenças entre as concentrações de ácido elágico de diferentes cultivares de morango, com intervalo de 199 a 522 mg.kg⁻¹ MF (GIL *et al.*, 1997; HÄKKINEN & TÖRRÖNEN, 2000).

Em morangos, as antocianinas são os flavonoides mais abundantes. De acordo com Lopes da Silva *et al.* (2007), antocianinas de morango são derivadas da pelargonidina e da cianidina agliconas. A molécula mais comum é a pelargonidina-3-glicosídeo. Em menor proporção, a cianidina-3-glicosídeo é encontrada em todas as variedades. Outras formas usualmente determinadas são pelargonidina-3-rutinosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, pelargonidina-3-arabinosídeo, além de antocianinas aciladas, tais como pelargonidina 3-acetilglicosídeo, pelargonidina succinilglicosídeo e pelargonidina-3-(6-malonilglicosídeo). Segundo Tamura *et al.* (1995), esta última antocianina pode ser indicada como uma das principais formas identificadas nas cultivares japonesas, em proporções que variam entre 5 e 30%. Lopes da Silva *et al.* (2007) identificaram pelargonidina 3-glicosídeo, pelargonidina 3-rutinosídeo, e cianidina 3-glicosídeo, em ordem decrescente, como as principais antocianinas presentes em morangos 'Osogrande' cultivados em Servilha, Espanha.

Os conteúdos de flavan-3-óis (catequina, epicatequina) superam os de flavonóis (quercetina, kaempferol, miricetina) em morangos (HÄKKINEN, 2000; ARTS *et al.*, 2000; HEINONEN *et al.*, 1998). Os ácidos fenólicos, hidroxicinâmicos ou hidroxibenzoicos são pouco estudados, quando comparados aos demais fenólicos, embora se reconheça que essa classe se apresenta em maiores concentrações do que a dos flavonóis e flavan-3-óis.

Estudando compostos fenólicos em morangos (Figura 16), Seeram *et al.* (2006) identificaram por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) o ácido elágico, o ácido elágico glicosilado, as elagitaninas, as galatotaninas, as antocianinas, os flavonoides e o cumaroil glicosilado.

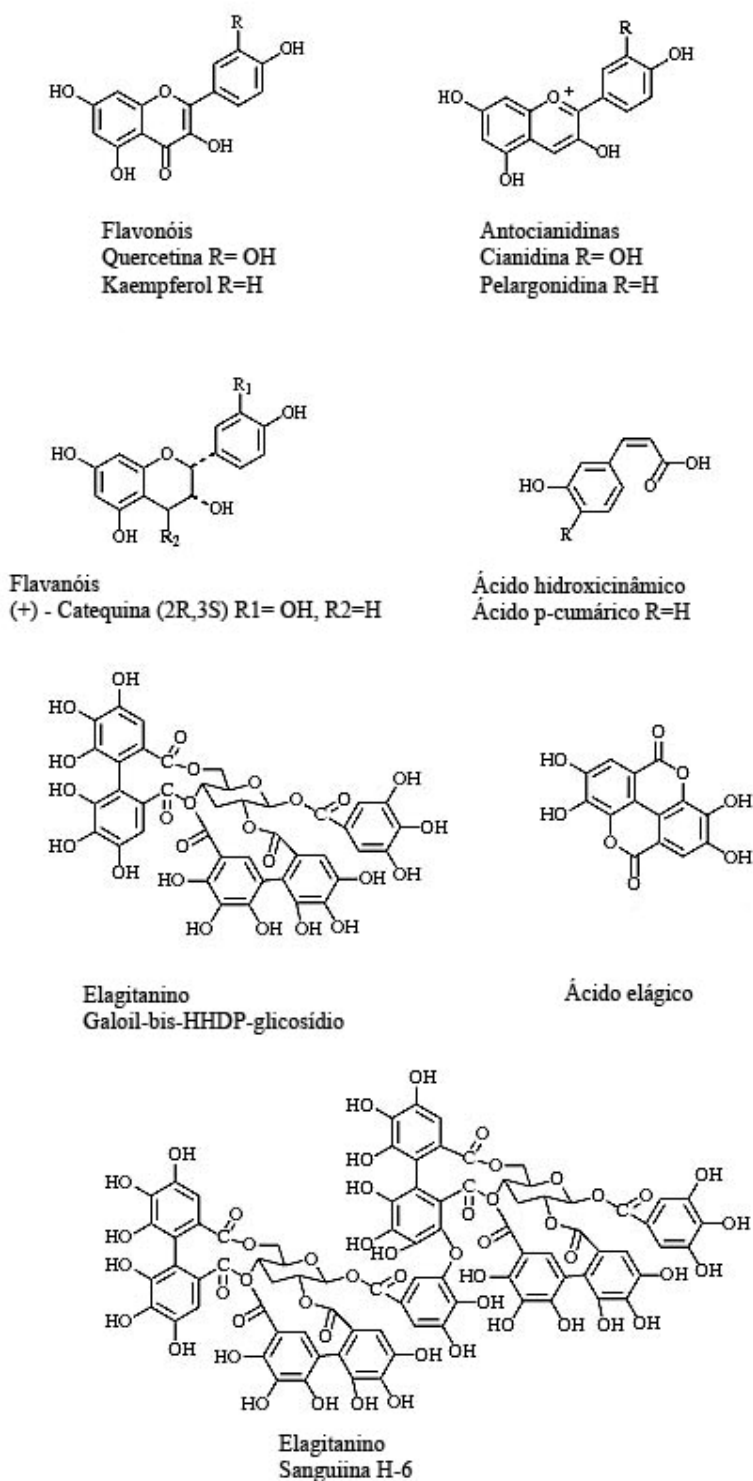


Figura 16 Exemplos de compostos fenólicos encontrados no morango (SEERAM *et al.*, 2006)

As antocianidinas identificadas foram pelargonidina e cianidina. A maior parte dos flavonoides aglicona encontrada era quercetina e kaemperol.

Häkkinen *et al.* (1999) identificaram e quantificaram por CLAE flavonoides e ácidos fenólicos em frutos e concluíram que o ácido elágico é o principal componente fenólico de morango, representando 51% do total de fenólicos analisados.

Segundo Daniel *et al.* (1989), em morangos, 96% do ácido elágico total estão presentes na polpa e quatro por cento nas sementes. Por outro lado, Maas *et al.* (1991) reportaram que o teor de ácido elágico foi mais elevado em sementes (8500 a 9000 mg.kg⁻¹) do que na polpa (1500 a 1600 mg.kg⁻¹) de morangos maduros.

Os teores de compostos fenólicos podem se alterar na fase pós-colheita e são influenciados pelos diferentes tipos de tratamentos adotados nesta fase.

Zheng *et al.* (2007) avaliaram as alterações nos teores de compostos fenólicos, antocianinas e a capacidade antioxidante de morangos, estocados a 5°C e expostos ao ar e a grandes pressões de oxigênio durante 14 dias, e reportaram um aumento na atividade antioxidante e nos teores de fenólicos totais e antocianinas totais aos 7 dias de armazenamento, em morangos estocados com pressão de oxigênio superior a 60kPa. Investigando o efeito de temperaturas de armazenamento na capacidade antioxidante de morangos, Ayala-Zavala *et al.* (2004) concluíram que frutos estocados a 5 e 10°C apresentaram maiores teores de fenólicos totais, antocianinas e capacidade antioxidante, do que frutos armazenados a 0°C, apesar de as demais características de qualidade comercial terem sido mais bem preservadas à temperatura mais baixa.

Cordenunsi *et al.* (2005), estudaram o efeito da temperatura de armazenamento na composição química e na atividade antioxidante de morangos dos cultivares Dover, Campineiro e Osogrande, produzidos no Brasil, e verificaram um aumento nos teores de antocianinas e vitamina C com o tempo, cujos valores foram diretamente proporcionais à temperatura de estocagem. Os teores de ácido elágico, flavonoides e fenólicos totais não se alteraram ou sofreram apenas leves decréscimos sob todas as temperaturas avaliadas (6, 16 e 25°C). Apesar da diferença nos teores de antocianinas entre

cultivares e do aumento nos seus teores, os autores não observaram diferença na capacidade antioxidante entre os materiais, que decresceu com o tempo independente da temperatura de estocagem, o que provavelmente está correlacionado ao decréscimo de ácido elágico e outros ácidos fenólicos.

1.3.5 Qualidade pós-colheita e processamentos

Apesar das prováveis vantagens do consumo de morango para a saúde, pelo seu conteúdo de flavonoides, uma das dificuldades para aumento da oferta deste fruto reside na sua alta perecibilidade.

O morango apresenta alta taxa respiratória e curta vida pós-colheita. Os danos mecânicos, as feridas e os choques durante a colheita, classificação, embalagem, transporte e comercialização deixam a fruta suscetível ao ataque de microorganismos, causando perdas nutricionais, qualitativas e econômicas (KADER, 1992; LIMA, 1999).

Segundo Wills (1998), a vida de prateleira não ultrapassa uma semana, mesmo em condições ideais de armazenamento a 0°C. Zhang & Quantick (1998) relatam que a vida de prateleira de morangos e framboesas em armazenamento refrigerado (0-4°C) é usualmente menor que 5 dias.

A vida de prateleira é frequentemente limitada pela infecção por fungos (GHAOUTH *et al.*, 1991). Em experimentos preliminares, conduzidos no Laboratório de Pós-colheita da Embrapa Hortaliças, foi verificado rápido crescimento fúngico em morangos cv. 'Festival', coletados em dezembro de 2007, em Brazlândia – DF (Figura 17). A época chuvosa contribuiu para a aceleração da deterioração do produto, por aumentar a incidência de infecção do tipo podridão mole.



Figura 17 Morangos cv. 'Festival' com contaminação por “mofo cinzento” e “podridão mole” após 4 dias de armazenamento em câmara fria a 5°C (Embrapa Hortaliças, dezembro de 2007).

O desenvolvimento de podridão causado por *Botrytis cinerea*, também conhecido como mofo cinzento, quando combinado com a perda de água, perda de firmeza e esmagamento durante a manipulação e o transporte, pode levar a perda de mais de 40% do produto, antes de chegar ao consumidor (WRIGHT & BILLETER, 1975).

Etileno pode ser sintetizado por *Botrytis cinerea*, desencadeando processos deteriorativos em frutos sensíveis como morango, mirtilo e kiwi (QADIR *et al.*, 1997). Outro tipo de podridão causada por *Rhizopus*, principalmente *Rhizopus stolonifer*, ocorre preferencialmente em pós-colheita, durante o processo de comercialização (ZHANG *et al.*, 2007). Caracteriza-se pelo amolecimento do fruto, com extravasamento do conteúdo celular, razão pela qual a infecção é conhecida como podridão mole. *Rhizopus* sintetizam poligalacturonases e quebram a estrutura das pectinas, acarretando a perda da firmeza. Apresentam micélios grossos brancos e poucos esporângios pretos, cobrindo a superfície do fruto (TOURNAS & KATSLOUDAS, 2005). A diminuição das perdas causadas por esta podridão é obtida com a proteção das plantas com o manejo equilibrado dos nutrientes e cobertura plástica, pois, como dito, a incidência aumenta em frutos que sofreram o molhamento pela chuva ou irrigação.

O alto grau de perecibilidade do morango, bem como o grande volume produzido na safra, pode acarretar grandes perdas pós-colheita. Desta forma, o processamento é uma das alternativas mais indicadas de consumo do produto

durante todo o ano. A industrialização pode ser feita na forma de congelados, enlatados, processados na forma de polpa para utilização em produtos lácteos (como matéria-prima ou aditivo de cor e sabor), ou na forma de sucos e geleias (MOTA, 2006; FILGUEIRA, 2003). O processamento de morango, feito imediatamente após a colheita, torna menos necessária a aplicação de fungicidas, o que contribui para o aspecto segurança sanitária do produto.

1.3.5.1 Processamento na forma de polpa

Segundo a legislação brasileira, polpa de fruta é o produto não fermentado, não concentrado, não diluído, obtido de frutos polposos, por processo tecnológico adequado, com um teor mínimo de sólidos totais provenientes da parte comestível do fruto. A polpa deverá ser obtida de frutas frescas, sãs e maduras, com as respectivas características do fruto (BRASIL, 2000).

As polpas são, então, encaminhadas para o congelamento, operação na qual a temperatura é reduzida abaixo de seu ponto de congelamento e uma proporção da água sofre a mudança de estado, formando cristais de gelo. A preservação é alcançada pela combinação de baixas temperaturas com a redução da atividade de água (Aa) do alimento (FELLOWS, 2006).

De acordo com Vendruscolo & Vendruscolo (2005), o congelamento de morangos ainda é o método de conservação mais utilizado, uma vez que, bem conduzido, preserva a cor e o sabor, afetando unicamente a textura.

Fellows (2006) relata que o congelamento causa mudanças negligenciáveis em pigmentos, aromas ou componentes nutricionais importantes. De acordo com o autor, esses elementos podem ser perdidos nos procedimentos de preparo ou deteriorados durante a estocagem sob congelamento. As vitaminas hidrossolúveis são perdidas a temperaturas de subcongelamento. Perdas de vitamina C são mais dependentes da temperatura; um aumento de 10° C na temperatura causa um aumento na taxa de degradação da vitamina de 30 a 70 vezes em frutas.

Vários autores relatam perdas consideráveis de vitamina C. Analisando a estabilidade da vitamina C em polpa de cagaita congelada, Silva *et al.* (2008), encontraram uma redução considerável durante quatro meses de análise. Em

outro estudo, realizado com polpa de maracujá processada e pasteurizada, Monteiro *et al.* (2005) encontraram perdas de vitamina C de até 80%, durante 180 dias sob refrigeração. Analisando frutos de caju *in natura*, armazenados sob congelamento num período de 120 dias, Lavinhas *et al.*, (2006) encontraram redução de vitamina C de 0,05% ao dia. Salles *et al.* (2004) analisando o efeito do congelamento na conservação pós-colheita da acerola, encontraram uma redução no teor de vitamina C em torno de 20%. Outro estudo, envolvendo frutos de acerola, realizado por Tavares *et al.* (1998) encontrou redução de 27% no teor de vitamina C, quando congelados e armazenados em câmara fria por 36 dias. Diferentemente dos resultados apresentados, Melo *et al.* (2000), analisando frutos de pitanga, armazenados sob congelamento (-18°C) durante 90 dias, não encontraram alterações de vitamina C em relação ao teor inicial apresentado.

A vitamina C é um dos nutrientes mais sensíveis às condições de processamento e armazenamento, sendo, por isso, grande o interesse tanto para os produtores de alimentos quanto para os consumidores. Os fatores que interferem na sua estabilidade são: oxigênio, pH, luz, temperatura, conteúdo de umidade ou atividade de água (FENNEMA, 1996).

No processamento do morango a desintegração celular do fruto aumenta a atividade oxidativa sobre a vitamina C, por elevar a taxa de degradação enzimática. Uma das enzimas de maior importância nesse processo é a ascorbato oxidase, que catalisa a oxidação do ácido L-ascórbico (forma biologicamente ativa) na presença de oxigênio molecular, produzindo o ácido deidroascórbico (DHAA) e água. O DHAA, por sua vez, sofre a reação de decomposição, por meio da abertura do anel por hidrólise, com a formação do ácido 2,3-diceto-L-gulônico, reação irreversível, que pode formar uma grande variedade de outros produtos nutricionalmente inativos (FENNEMA, 1996; PENTEADO, 2003). A oxidação do ascorbato pela ascorbato oxidase aumenta em condições de injúria e estresse metabólico no tecido, exposição a patógenos, temperaturas elevadas, agentes químicos e íons metálicos (LEE & KADER, 2000).

O próprio processo de despulpamento de frutas pode causar mudanças significativas nas características e valor nutricional do alimento. O rompimento das células e o aumento da área superficial resultante promovem a

deterioração oxidativa e maiores taxas de atividade microbiana e enzimática. Alimentos úmidos, como é o caso das frutas e hortaliças, em especial, deterioram-se rapidamente, se outras medidas preservativas (refrigeração, congelamento ou processo térmico) não forem tomadas (FELLOWS, 2006).

Compostos fenólicos podem ser degradados, assim como a vitamina C, pela presença de oxigênio, luz, pH e temperatura. As enzimas envolvidas nessa degradação são a polifenol oxidase (PPO) e a peroxidase (POD), que causam o escurecimento em frutas e vegetais. O produto inicial da oxidação é a quinona, que rapidamente se condensa, formando pigmentos escuros insolúveis, denominados melanoidinas, ou reage não-enzimaticamente com outros compostos fenólicos, aminoácidos e proteínas, formando também melanoidinas. As reações de escurecimento enzimático ocorrem no tecido vegetal quando há ruptura da célula e a reação não é controlada, ou, também, no tecido intacto, quando em situação de inibição da respiração durante o armazenamento em atmosfera controlada, no uso de embalagens impróprias, na deficiência de ácido ascórbico no tecido vegetal, entre outros. Outra ação não desejável dessa enzima é a formação da o-quinona, que pode interagir com grupos amina e tiol, reduzindo a disponibilidade da lisina, metionina, tiamina e outros nutrientes essenciais. O pH do fruto é relevante para a atividade enzimática, tendo em vista que a enzima é inibida em pH menor do que 4,0 (ARAÚJO, 1999). No caso de morangos, cujo pH está entre 3,0 e 3,4, a ação dessa enzima é pouco relevante.

Quanto aos fenólicos, estudos têm sido recentemente conduzidos para avaliação da perda desses compostos durante o armazenamento ou após o processamento industrial de frutas e hortaliças. Com relação ao processamento de morango, estudos sobre a avaliação de polpas, purês, sucos e néctares, tratados termicamente, congelados, ou submetidos a tecnologias emergentes de conservação, foram recentemente publicados.

Tiwari *et al.* (2009a) avaliaram o efeito do tratamento por ultrassom na degradação da cor, das antocianinas e da vitamina C em suco de morango. Foi observado que um aumento na amplitude e no tempo de tratamento resultou em decréscimo das concentrações de pelargonidina-3 glicosídeo, ácido ascórbico, a^* e b^* além do acréscimo de L^* . Todavia, um leve aumento no teor de pelargonidina-3-glicosídeo foi verificado sob menores níveis de amplitude e

menor tempo de processamento. Em outro estudo Tiwari *et al.* (2009b) investigaram o efeito do processo de conservação por ozônio (1,6 – 7,8% m/m, 0-10 minutos) em sucos de morango. Reduções significativas nos teores de antocianinas (98,2%) e ácido ascórbico (85,8%) foram verificadas quando o suco sofreu o tratamento mais extremo, de 7,8% por 10 minutos.

Oszmianski & Wojdylo (2009) determinaram as concentrações de compostos fenólicos e a atividade antioxidante em diferentes tipos de suco de morango (purê, suco prensado e suco clarificado) de três cultivares (Elkat, Kent e Senga Sengana). Os compostos fenólicos foram avaliados nos produtos frescos e após 6 meses a 4 e 30°C. O processo de clarificação resultou na maior perda de fenólicos. A maior concentração de fenólicos e a maior atividade antioxidante foi observada em purês, seguidos de suco prensado e suco clarificado, para todas as cultivares. Os processamentos tiveram menos efeito sobre a catequina, antocianinas, ácido p-cumárico, quercetina e derivados de kaempferol. O processamento exerceu menos efeito nas concentrações de antocianinas do que o armazenamento. Todas as amostras exibiram uma perda elevada de antocianinas durante o armazenamento a 30°C, e perdas moderadas quando armazenadas a 4°C. A presença de pectina em sucos não clarificados parece proteger as antocianinas contra a degradação. Os processos de co-pigmentação com proantocianidinas também exercem efeito protetor.

Flutuações nos conteúdos de fenólicos e na atividade antioxidante de sucos de seis frutas vermelhas durante 29 dias de armazenamento refrigerado foram investigadas por Piljac-Zegarac *et al.* (2009). Um aumento de 7% nos teores de fenólicos totais foi observado em suco de morango. O suco de morango apresentou maior concentração de ácido ascórbico. Porém uma redução de 58% nos teores dessa vitamina foi observada após 28 dias. Para todos os sucos, após 29 dias, uma queda de 20 a 52% na atividade antioxidante por DPPH foi observada.

Patras *et al.* (2009) compararam os impactos de processamento por alta pressão (400, 500, 600 MPa/15 minutos/10–30 °C) e tratamento térmico convencional (70°C/2 minutos) na atividade antioxidante total, compostos fenólicos, ácido ascórbico antocianinas e cor de polpas de morango e *blackberry*. Diferentes tratamentos de alta pressão não afetaram o conteúdo de

vitamina e antocianinas, ao contrário do processo térmico. A atividade antioxidante foi mais elevada e as alterações de cor mais reduzidas em purês tratados por pressão, indicando que este tratamento foi mais eficaz na manutenção das características de qualidade avaliadas nos purês, em comparação ao tratamento térmico.

No estudo de Gossinger *et al.* (2009) foram avaliadas as diversas operações unitárias na estabilidade da cor e no conteúdo de antocianina de néctares preparados a partir de polpa de morango. Entre as etapas avaliadas estão a utilização de morangos congelados, a temperatura do processo (10-20°C), o peneiramento, a redução do pH e a temperatura de armazenamento (20°C x 4°C). O uso de morangos congelados melhorou significativamente a estabilidade da cor dos néctares, mesmo que por períodos longos e permitiram a produção de néctares com 12 meses de vida de prateleira sem aditivos. Observou-se um efeito negativo de altas temperaturas do processo sobre os conteúdos de antocianinas, bem como da redução do pH sobre a cor e a estabilidade de antocianinas monoméricas. O peneiramento não ocasionou nenhum efeito sobre a estabilidade da cor e o teor de pigmentos antociânicos. Quanto mais elevada a temperatura de armazenamento, maiores eram os impactos sobre a estabilidade das variáveis analisadas, sendo que o néctar armazenado a 4°C permaneceu aceitável por mais de 12 meses. Comparando o armazenamento de morangos a -80°C e a -18°C por 7 meses, nesta última temperatura as atividades de PPO e POD foram surpreendentemente menores. Não houve a inativação completa dessas enzimas em nenhuma das operações unitárias. A atividade da POD foi mais afetada pelo pH do que a da PPO.

Hartman *et al.* (2008) investigaram o efeito do tratamento enzimático, do despulpamento e da pasteurização em algumas características de qualidade antioxidante de sucos processados e polpas de morango. A capacidade antioxidante decresceu em todas as etapas do processo com exceção do tratamento térmico, em que a atividade antioxidante foi aumentada, provavelmente pela formação de produtos ativamente antioxidantes da Reação de Maillard. O conteúdo de ácido ascórbico foi reduzido em 77% durante o processamento dos frutos em polpa. No suco prensado, a perda de ácido ascórbico foi de 37%. O declínio das concentrações de polifenóis e antocianinas foi menor (entre 30-40%) ao longo do processo. A prensagem e a

pasteurização foram as etapas mais críticas para a redução observada nestes componentes. O tratamento enzimático por 90 minutos do resíduo de peneiragem promoveu a liberação de produtos do metabolismo secundário vegetal e a redução em 20% da vitamina C.

O impacto do processamento de morango nas formas de suco clarificado pasteurizado (8°Brix) e suco concentrado (65°Brix), fortificados com derivados de pelargonidina, foi estudado por Garzón & Wrolstad (2002). Os produtos foram armazenados a 25°C. As alterações degradativas de antocianinas e de ácido ascórbico seguiram a cinética de reação de primeira ordem. Com a fortificação o tempo de meia-vida dos pigmentos foi elevada de 3,5 para 5 dias nos sucos concentrados e de 5 para 12 dias para sucos clarificados pasteurizados. O tempo de meia-vida do ácido ascórbico foi de 2 dias nas amostras de suco e variaram de 3 para 10 dias no produto concentrado. Ambos os produtos sofreram alterações na tonalidade e na saturação da cor, mas mantiveram os valores de luminosidade.

Aaby *et al.* (2007) avaliaram composição e atividade antioxidante de polpa de morango processada e armazenada a 6 e 22°C, durante 8 e 16 semanas. Os autores observaram que após o processamento havia uma retenção de 55% do ácido ascórbico, 85% das antocianinas, 80% de elagitaninos e fenólicos totais, 76% da atividade antioxidante por FRAP e 88% da atividade antioxidante pelo método ORAC. Durante o armazenamento, houve redução nos teores de todos antioxidantes, mas o ácido ascórbico foi o mais afetado, sendo totalmente degradado após 8 semanas. Os elagitaninos foram os componentes fenólicos mais preservados em ambas as condições de armazenamento. Os teores de antocianinas totais e fenólicos totais foram mais afetados a 22°C.

No estudo de Klopotek *et al.* (2005), morangos foram transformados em suco, néctar, vinho e polpa e foi investigado o conteúdo de ácido ascórbico e de fenólicos totais, para determinar os efeitos do processamento. Os autores concluíram que o teor de ácido ascórbico diminuiu nas etapas de processamento mas não houve remoção de grandes quantidades de compostos fenólicos nos diferentes produtos.

1.3.5.2 Processamento na forma de geleia

As Normas Técnicas Relativas a Alimentos e Bebidas, constantes da Resolução nº 12 de 24 de julho de 1978 (BRASIL, 1978), definem geleia de fruta como o produto obtido pela cocção de frutas, inteiras ou em pedaços, polpa ou suco de fruta, com açúcar e água, concentrado até a consistência gelatinosa, podendo sofrer a adição de glicose ou açúcar invertido. Ela não pode ser colorida nem aromatizada artificialmente, sendo tolerada a adição de acidulantes e de pectina, caso necessário, para compensar qualquer deficiência do conteúdo natural de acidez da fruta ou do geleificante. A consistência deve ser tal que, quando extraída de seu recipiente, seja capaz de se manter no estado semi-sólido. Uma combinação adequada desses componentes, tanto na qualidade como na ordem de colocação durante o processamento, deve ser respeitada para obter uma maior qualidade da geleia (LAGO *et al.*, 2006).

Os métodos de processamento térmico de geleia mais utilizados em indústrias são a cocção em vapor, em água em ebulição ou em tacho aberto. Tais processos, aplicados isoladamente ou associados a processos mecânicos e às condições de armazenamento, podem levar a alterações nas características físicas e na composição química dos alimentos, bem como em suas propriedades benéficas à saúde. A perda desses efeitos benéficos pode ocorrer por redução da atividade antioxidante durante o processamento e estocagem (NICOLI *et al.* 1999; 1997).

O efeito do processamento na capacidade antioxidante de morangos, medida em *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), foi avaliado em geleias por Wicklund *et al.*, (2005). Como conclusão, os autores observaram decréscimo nos teores de antocianinas, durante 3 meses de armazenamento, e maiores teores de antocianinas e maior capacidade total antioxidante, em geleias estocadas a 4°C, do que em geleias estocadas a 20°C. Não houve diferença entre os armazenamentos sob luz ou no escuro. Adicionalmente, houve grande diferença na capacidade antioxidante de geleias fabricadas com diferentes cultivares de morango.

Mota (2006) avaliou o efeito do processamento e armazenamento por 90 dias nas características de geleia de amora preta. Verificou-se que o

aquecimento da polpa na elaboração da geleia resultou em uma redução de 8,8% no teor inicial de antocianinas totais. O armazenamento também resultou em perda de antocianinas, em média 32% nos primeiros 40 dias e mais 11% nos 50 dias subseqüentes. Os teores de antocianinas totais obtidos na geleia variaram de 98,58 mg/100g a 170,66 mg/100g, o que caracteriza este produto como um alimento rico em compostos fenólicos, mesmo após as perdas pós-processamento.

A influência do tempo e da temperatura de processamento na cor de geleias de morango, bem como do tempo e exposição à luz durante o armazenamento foram avaliadas por García-Viguera *et al.* (1999). O tempo de processamento foi determinante para a qualidade da cor, sendo que a ebulição do produto por mais do que 15 minutos apresentou efeito deletério. Os autores reportaram que o efeito da luz do dia durante o armazenamento ocasionou perdas de cor e de antocianinas insignificantes, em comparação ao armazenamento ao abrigo da luz. Todavia, não houve nenhuma relação direta entre os teores de antocianinas e a cor durante o processamento ou armazenamento, sob nenhuma das condições testadas no trabalho.

Kim & Padilla-Zakour (2004) estudaram o impacto do processamento nos compostos fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante de geleias de framboesa, ameixa e cereja ácida. Na base de 100g de frutas frescas, foi verificado que o processamento e o aquecimento durante a fabricação das geleias ocasionaram decréscimos nos conteúdos de fenólicos totais, de antocianinas totais e na atividade antioxidante, expressa em equivalentes de vitamina C. As maiores perdas ocorreram nos teores de antocianinas totais. A retenção desses pigmentos variou entre 89% e 21%. Os resultados ainda indicaram que mais do que 73% dos fenólicos totais e mais do que 65% da capacidade antioxidante foram retidos após o processamento dos frutos em geleias.

Apesar das altas concentrações de açúcar presentes na geleia, acredita-se que as porções diárias consumidas são pequenas e suficientes para um aporte significativo de compostos fenólicos, visto que esse tipo de processo promove a concentração dos compostos presentes na matéria-prima por meio da perda de água, podendo ser mais significativo do que o efeito degradativo

do processamento térmico. Todavia, diferenças nas condições de processos podem acarretar resultados diferentes no produto final.

Tendo em vista a importância dos métodos de conservação industrial para a redução de perdas pós-colheita de alimentos ricos em compostos de interesse para a saúde, é de grande relevância avaliar se as características químicas das matérias primas vegetais sofrem alterações após o processamento e o armazenamento, bem como se essas alterações são significativas e desmerecem a tecnologia empregada.

Os governos, o setor agroindustrial e a comunidade científica estão entusiasmados com o potencial dos alimentos funcionais de melhorar a saúde dos cidadãos, de promover a diversificação da dieta e a viabilização comercial de produtos de alto valor agregado, criando assim nichos de mercado para a agricultura familiar e para o extrativismo sustentável. A PNAN (BRASIL, 2003) contempla, em sua primeira diretriz programática, o estímulo às ações intersetoriais com vistas ao acesso universal aos alimentos, consistindo, entre outros pontos, em acesso ao trabalho, ao emprego e à renda; à produção, ao armazenamento e à distribuição dos produtos agrícolas; ao crédito agrícola e ao estímulo ao produtor (PINELI, 2005). Por esta razão, e por ser o morango, em grande parte, produzido por pequenos e médios produtores, tem o presente trabalho uma possibilidade de contribuição a esta importante política, que visa à segurança alimentar em todos os seus aspectos. Por outro lado, dar aos consumidores acesso a informações cientificamente respaldadas, sobre as propriedades nutricionais e extranutricionais de frutas e hortaliças, seja na forma fresca ou processada, é igualmente relevante por estimular o consumo de alimentos que possam trazer benefícios à saúde.

1.4 REFERÊNCIAS

AABY, K.; WROLSTAD, R. E.; EKEBERG, D.; SKREDE, G. Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees: impact of achene level and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55(13), 5156-66, 2007.

AABY, K.; SKREDE, G.; WROLSTAD, R.E. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 10, 4032-4040, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA (Brasil). Portaria n° 386, de 26 de setembro de 2005. Altera a denominação e a composição da Comissão instituída pela Portaria n° 15 ANVISA, de 30 de abril de 1999 para Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde e Novos Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 27 set. 2005. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=18884>. Acesso em: 12 dez. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA (Brasil). Portaria n° 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 03 maio. 1999. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=11297&mode=PRINT_VERSION>. Acesso em: 24 out.2005. 1999a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA (Brasil). Resolução n° 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 03 nov. 1999. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=109>>. Acesso em: 6 abr. 2005. 1999b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA (Brasil). Resolução n° 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 10 dez. 1999. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=110>>. Acesso em: 30 ago. 2005. 1999c.

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. **Nutrition**, 18 (1), 75-81, 2002.

ALLENDE, A; MARÍN, A; BUENDÍA, TOMÁS-BARBERÁN, BF; GIL, MI. Impact of combined postharvest treatments (UV-C light, gaseous O₃, superatmospheric O₂ and high CO₂) on health promoting compounds and shelf-life of strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, 46, 201–211, 2007.

ALONSO, A. M.; DOMINGUEZ, C.; GUILLEN, D.A.; BARROSO, C.G. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 50 (21), 5832-5836, 2002.

AMARO, M.C.C. **A cadeia produtiva agro-industrial de morango nos municípios de Pelotas, Turucu e São Lourenço**. Dissertação de mestrado. (Programa de Pós- Graduação em Administração / Escola de Administração / Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Porto Alegre, 2002. 91p.

ANDERSEN, Ø.M., FOSSEN, T., TORSKANGERPOLL, K., FOSSEN, A., HAUGE, U. Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin. **Phytochemistry**, 65, 405–410, 2004.

ANDRIAMBELOSON E, MAGNIER C, HAAN-ARCHIPOFF G, LOBSTEIN A, ANTON R, BERETZ A, STOCLET JC, ANDRIANTSITOHAINA R. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium- dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. **Journal of Nutrition**, 128, 2324-2333, 1998.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, 125, 989–1009, 2000.

ANTTONEN M.J., HOPPULS K.I., NESTBY M.J., KARJALAINEN R.O. Influence of fertilization, mulch color, early forcing, fruit order, planting date, shading, growing environment, and genotype on the contents of selected phenolics in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 2614–2620, 2006.

ANUARIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2006. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2006. 136 p.

ARAI, S. Studies on functional foods in Japan – State of the art. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 60, (1), 9-15, 1996.

ARAÚJO, J.M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 1999. 416p.

ARAYA, H.; LUTZ, M.R. Alimentos funcionales y saludables. **Revista Chilena de Nutrición**, 30, (1), 8-14, 2003.

ARTS I.C., VAN DE PUTTE B., HOLLMAN P.C.H. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, stable foods, and processed foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; 48, 1746–1751, 2000.

ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, 523–524, 9–20, 2003.

ASAMI, D. K., HONG, Y.-J., BARRETT, D. M., MITCHELL, A. E. Comparison of the total phenolics and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 1237–1241, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15th ed., 2:1058-1059, Arlington: A.O.A.C. (method 967.21), 1990.

AUGER, C.; GERAIN, P.; BICHON, F.L.; PORTET, K.; BORNET A.; CAPORICCIO B., Phenolic from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms others than antioxidant effect. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 5297–5302, 2004.

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

AYDOGMUS, Z.; CETIN, S.M.; ÖZGÜR, M.U. Determination of Ascorbic Acid in Vegetables by Derivative Spectrophotometry. **Turk Journal of Chemistry**, 26, 697 – 704, 2002.

BALBINO, J.M.S. **Tecnologias para produção, colheita e pós-colheita de morangueiro**. Vitória, Ed Incaper, 2006. 78p.

BATTESTIN, V., MATSUDA, L. K.; MACEDO, G.A. Fontes e aplicações de taninos e tanases nos alimentos. **Alimentos e Nutrição**, 15 (1), 63-72, 2004.

BECKMAN, K. B., AMES, B. N. Oxidative decay of DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, 272 (32), 19633-19636, 1997.

BENNET, R.N.; WALLSGROVE, R.M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, 127, (4), 617-633, 1994.

BERBARI, S. A. G.; NOGUEIRA, J. N.; CAMPOS, S. D. S. Efeito de diferentes tratamentos pré-congelamento sobre a qualidade do morango var. Chandler congelado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 18, 1, 1998.

BICKFORD, P.C.; GOULD, T.; BRIEDERICK, L.; CHADMAN, K.; POLLOCK, A.; YOUNG, D.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. **Brain Research**, 866, (1-2), 211-217, 2000.

BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of epidemiological evidence. **Nutrition and Cancer**, 18, 1-29, 1992.

BORGUINI, R.G. **Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) orgânico: o conteúdo nutricional e opinião do consumidor**. Tese (Mestre em Agronomia / Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, Piracicaba, 2006. 110p.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, S.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, 186, 343-355, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Alimentação e**

Nutrição. 2^a. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Alimentação e Nutrição. 2^a. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 01, de 7 de janeiro de 2000. Aprova padrões de identidade e qualidade para polpas de frutas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 janeiro 2000, seção 1, p. 54. de 2000, seção 1, p. 54.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Aprova **Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, relativas a alimentos e bebidas**. Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA n. 12, de 24 de julho de 1978. Seção I, pt I. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 10 out. 2008.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Review**, 56, 317–33, 1998.

BRENNAN L. A., MORRIS G. M., WASSON G. R., HANNIGAN B. M., BARNETT Y. A. The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H₂O₂-induced DNA damage in human lymphocytes. **British Journal of Nutrition**, 84, 195–202, 2000.

BÜYÜKBALCI, A.; NEHIR EL, S. Determination of In Vitro Antidiabetic Effects, Antioxidant Activities and Phenol Contents of Some Herbal Teas. **Plant Foods in Human Nutrition**, 63, 27–33, 2008.

BURNS, J.; GARDNER, P.T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G.G.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49, 5797-5808, 2001.

CAI H, HARRISON DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation Research**, 87, 840–4, 2000.

CAMARGO, L. S.; PASSOS, F.A. Morango. In: FURLANI, A. M. C.; VIÉGAS, G. P. **O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico**. Campinas. Instituto Agronômico, 411-432, 1993.

CANTILLANO, R.F.F. Fisiologia e manejo na colheita e pós-colheita de morangos. In. CARVALHO, S.P de (Coord.). **Boletim do morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico**. Belo Horizonte: FAEMG, 97-105, 2006.

CAPOCASA, F.; SCALZO, J.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: The role of genotype. **Food Chemistry**, 111, 872–878, 2008.

CARR, A.C.; FREI, B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, 69, 1086–1107, 1999.

CHEN, H.; ZUO, Y.; DENG, Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**, 913, 387–395, 2001.

CHEN, C-C.; LIU, L-K.; HSU, J.D.; HUANG, H.P.; YANG, M.Y.; WANG, C.J. Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Food Chemistry**, 91, 601–607, 2005.

CLIFFORD, M.N., SCALBERT, A. Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80, 1118–1125, 2000.

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

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 2581–2586, 2002.

CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J. R. O.; LAJOLO, F. M. Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage. **Food Chemistry**, 83, 167-173, 2003.

CORDENUNSI, BR; 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 Chemistry**, 93 (1), 113-121, 2005.

COVARRUBIAS, L.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, D.; SCHNABEL, D.; SALAS-VIDAL, E.; CASTRO-OBREGÓN, S. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? **Developmental Biology**, 320, 1–11, 2008.

CRAWFORD, S.; KIRK, E.A.; ROSENFELD, M.E.; LEBOEUF, R.C.; CHAIT, A. Dietary antioxidants inhibit development of fatty streak lesions in the LDL receptor-deficient mouse. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, 18, 1506–1513, 1998.

CROZIER, A., BURNS, J., AZIZ, A. A., STEWART, A. J., RABIAS, Z. H. S., JENKINS, G. I., EDWARDS, C. A.; LEAN, M. E.J. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. **Biology Research**, 33, 79-88, 2000.

DALLE-DONE, ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, 329, 23–38, 2003.

DANGLES O, SAITO N, BROUILLARD R. Anthocyanin intramolecular copigment effect. **Phytochemistry**, 34, 119- 124, 1993.

DANIEL, E. M.; KRUPNICK, A. S. Y. H.; BLINZLER, J. A.; NIMS, R. W.; STONER, J. D. Extraction, stability and quantification of ellagic acid in various fruits and nuts. **Journal of Food Composition Analysis**, 2, 338-349, 1989.

DARROW, G.M. **The Strawberry. History, Breeding and Physiology**. Holt, Rinehart and Winston, New York, 1966.

DAVIS, T; DEHAAN, K. **An Introduction to Strawberries**. Disponível em: <http://strawberrygenes.unh.edu/history.html>. Acesso em 12 dez 2008.

DIAS. M.S.C. Morango. In. VENZON M.; DE PAULA JUNIOR, T.J. (Coords.): **101 Culturas - Manual de Tecnologias Agrícolas**. EPAMIG, Belo Horizonte. 800p. 2007.

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

DRODGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Review**, 82: 47, 2001.

DUTHIE, S.J.; JENKINSON, A.M.; CROZIER, A.; MULLEN, W.; PIRIE, L.; KYLE, J.; YAP, L.S.; CHRISTEN, P; DUTHIE, G.G. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. **European Journal of Nutrition**, 45, 113–122, 2006.

DUTHIE, G. G.; GARDNER, P.T.; KYLE, J.A. Plant polyphenols: Are they the new magic bullet? **Proceedings of Nutrition Society**, 62, 599–603, 2003.

EITENMILLER, R. R., LANDEN, W. O. JR. **Vitamin analysis for the health and food sciences**. Boca Raton: CRC Press, 1999.

EMPRESA DE ASSISTENCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. EMATER. **Festa do Morango de Brasília São Esperados mais de 100 mil visitantes**. Disponível em: <http://www.emater.df.gov.br/>. Acesso em 16. dez. 2008.

ERLUND, I.; KOLI, R.; ALFTHAN, G.; MARNIEMI, J.; PUUKKA, P.; MUSTONEN, P.; MATTILA, P.; JULA, A. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. **American Journal of Clinical Nutrition**, 87:323–331, 2008.

FACCHINI FS, HUA NW, REAVEN GM, STOOHS RA. Hyperinsulinemia: the missing link among oxidative stress and agerelated disease? **Free Radical Biology Medicine**, 29,1302–1306, 2000.

FELLOWS, P. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2º ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2006. 602p.

FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. 3. ed. New York, NY: Marcel Dekker, 1996. 1069 p.

FENTON, H. J. H. The oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of Chemistry Society Proceedings**. 10, 157–158, 1984.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2003.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **Journal of Biological Chemistry**, 12, 239-43, 1912.

FONTANNAZ, P. ;KILINÇ, T.; HEUDI, O. HPLC-UV determination of total vitamin C in wide range of fortified food products. **Food Chemistry**, 94 (4), 626-631, 2006.

FOSSÉN, T.; RYAN, S.; ANDERSON, M. Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin-3- glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. **Phytochemistry**, 65, 1421–1428, 2004.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, 201,1203-1209, 1998.

FUKUMOTO L, MAZZA G. Assessing antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48, 3597-3604, 2000.

GALLOWAY, T., HANDY, R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. **Ecotoxicology**. 12, 345-363, 2003.

GALVANO F, FAUCI LL, LAZZARINO G, FOGLIANO V, RITIENI A, CIAPPELLANO S, BATTISTINI NC, TAVAZZI B, GALVANO G. Cyanidins: metabolism and biological properties. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 15, 2-11, 2004.

GARCIA-VIGUERA, C., ZAFRILLA, P., ROMERO, F., ABELLAN, P., ARTES, F., TOMAS-BARBERAN, F. A. Color stability of strawberry jam as affected by cultivar and storage temperature. **Journal of Food Science**, 64, 243±247, 1999.

GARZÓN, G.A.; WROLSTAD, R.E. Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate, **Journal Food Science**, 67, 1288–1299, 2002.

GHAOUTH, A., ARUL, J., PONNAMPALAM, R.; BOULET, M. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. **Journal Food Science**, 56 (6), 1618–1620, 1991.

GIL, M.I., HOLCROFT, D.M., KADER, A.A. Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 1662–1667, 1997.

GIL, M. I.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 4581–4589, 2000.

GHOSH, D.; KONISHI, T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. **Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition**, 16 (2):200-208, 2007.

GOLDBERG, D. M., HOFFMAN, B., YANG, J.; SOLEAS, G. J. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 47, 3978–3985, 1999.

GÖSSINGER, M.; MORITZ, S.; HERMES, M.; WENDELIN, S.; SCHERBICHLER, H.; HALBWIRTH, H.; STICH, K.; BERGHOFER, E. Effects of processing parameters on color stability of strawberry nectar from puree. **Journal of Food Engineering**, 90, 171–178, 2009.

GRUNDHÖFER, P., NIEMETZ, R., SCHILLING, B.; GROSS, G. G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry**, 57, 915–927, 2001.

HADDOCK, E.A; GUPTA, R. K.; AL-SHAFI, S.M.K.; LEYDON, K.; HASLAM, E. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants: biogenics and molecular taxonomic considerations. **Phytochemistry**, 21: 1049–1062, 1982.

HAHLBROCK, K., SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 40, 347-369, 1989.

HAKALA M., LAPVETELÄINEN A., HUOPALAHTI R., KALLIO H., TAHVONEN R. Effects of varieties and cultivation conditions on the composition of strawberries. **Journal of Food Composition Analysis**, 16, 67-80, 2003.

HÄKKINEN, S.; TÖRRÖNEN, A.R. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. **Food Research International**, 33: 517-524, 2000.

HÄKKINEN, S. **Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products**. Doctoral dissertation. (Faculty of Medicine / University of Kuopio). Kuopio University Publications D. Medical Sciences 221. KUOPIO, 2000.

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

HÄKKINEN, S.H., KÄRENLAMPI, S.O., HEINONEN, I.M., MYKKÄNEN, H.M.; TÖRRÖNEN, A.R. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 77, 543–551, 1998.

HALLBERG L.; HULTHEN, L. Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. **American Journal of Clinical Nutrition**, 71, 1147–60, 2000.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation, a radical chain reaction. In: HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. (ed). **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3rd ed. Clarendon, Oxford., 1989. 900p.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Journal of Biochemistry**, 401, 1–11, 2007.

HAMMER, K.; PISTRICK., K. New versus old scientific names in strawberries (*Fragaria L.*). **Genet. Res. Crop. Evol.** 50: 789-791, 2003.

HANNUM, S. M. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44 (1), 1-17, 2004.

HARBORNE JB (1980) Plant phenolics. In: BELL, E.A.; CHARLWOOD, B.V. (eds) **Encyclopedia of Plant Physiology**, volume 8 Secondary Plant Products, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. London, UK: Chapman & Hall, 1988. 288p.

HARRIS, R.S. Effects of agricultural practices on the composition of foods. In: Harris, R.S., Karmas, E. (Eds.) **Nutritional Evaluation of Food Processing**, 2nd edn. AVI, Westport, CT. 33–57, 1975.

HARTMANN, A.; PATZ, C-D.; ANDLAUER, W.; DIETRICH, H.; LUDWIG, M. Influence of Processing on Quality Parameters of Strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 9484–9489, 2008.

HASLAM, E. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in higher plants. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, 41, 1–46, 1982.

HASLAM, E. **Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1998.

HASLER, C. M. Functional Foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, 52 (11), 63-70, 1998.

HEINONEN, I. M.; MEYER, A. S.; FRANKEL, E. N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 4107-4112, 1998.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals (chapter 12). In: **Functional Metabolism Regulation and Adaptation**, Editado por K. B. Storey, John Wiley e Sons, Hoboken, New Jersey, USA pp 319-368, 2004.

HERNANZ, D.; RECAMALES, A.F.; MELENDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; GONZALES-MIRET, M.L.; HEREDIA, F.J. Assessment of the Differences in the Phenolic Composition of Five Strawberry Cultivars (*Fragaria ananassa* Duch.) Grown in Two Different Soilless Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 1846-1852, 2007.

HERNANZ, D. RECAMALES, A.F.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; GONZÁLEZ-MIRET, M.L. HEREDIA, F.J. Multivariate Statistical Analysis of the Color/Anthocyanin Relationships in Different Soilless-Grown Strawberry Genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56 (8), 2735-2741, 2008.

HERRMANN, K. Flavonoids and flavones in food plants: a review. **Journal of Food Technology**, 1, 433-448, 1976.

HERRMANN, K. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. **Food Research and Technology**, 186, 1–5, 1988.

HORST, M.A.; LAJOLO, F.M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. In: Silvia Maria Franciscato Cozzolino. (Org.). **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1: 697-731, 2007.

HSU C.L., YEN G.C. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. **Molecular Nutrition and Food Research**, 50(11), 1072-1079, 2006.

HUTCHINSON, J. **Flowering plants of the world**. Oxford, Oxford University Press, 1978. 335p.

JENKINS, D.J.A; NGUYEN, T.H.; KENDALL, C.W.C.; FAULKNER, D.A.; BASHYAM, B.; KIM, I.J, IRELAND, C.; PATEL, D et al. The effect of strawberries in a cholesterol-lowering dietary portfolio. **Metabolism Clinical and Experimental**, 57, 1636-1644, 2008.

KADER, A.A. Influence of preharvest and postharvest environment on nutritional composition of fruits and vegetables. In: Quebedeaux, B., Bliss, F.A. (Eds.), **Horticulture and Human Health: Contributions of Fruits and Vegetables**. Proceedings of the 1st International Symposium on Horticulture and Human Health. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 18–32, 1988.

KADER, A.A. Postharvest biology and technology: an overview. In: KADER, A.A. **Postharvest Technology of Horticultural Crops**. Oakland: University of California, 1992. p.15-20. (Publication, 3311).

KAFKAS, E., KOSAR, M., PAYDAS, S., KAFKAS, S., BASER, K.H.C. Quality characteristics of strawberry genotypes at different maturation stages. **Food Chemistry**, 100, 1229–1236, 2007.

KALL, M.A.; ANDERSEN, C. Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. **Journal of Chromatography B Biomedical Sciences Application**, 730, 101–111, 1999.

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

KAUL, A., KHANDUJA, K.L. Polyphenols inhibit promotional phase of tumorigenesis: Relevance of superoxide radicals. **Nutrition and Cancer**, 32, 81-85, 1998.

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

KEKRER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury. **Critical Reviews in Toxicology**, 23, 21-48, 1993.

KHANDUJA, K.L.; GANDHI, R.K.; PATHANIA, V; SYAL, N. Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. **Food Chemistry and Toxicology**, 37: 313-318, 1999.

KIM, D.O., PADILLA-ZAKOUR, O.I. Jam processing effect on phenolics and antioxidant capacity in anthocyanin-rich fruits: cherry, plum, and raspberry. **Journal of Food Science**, 69, S395–S40, 2004.

KLOPOTEK, Y.; OTTO, K.; BOHM, V. Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53 (14), 5640-5646, 2005.

KNEKT, P., KUMPULAINEN, J., JARVINEN, R., RISSANEN, H., HELIOVAARA, M., REUNANEN, A., HAKULINEN, T., AND AROMAA, A.

Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **American Journal of Clinical Nutrition**, 76: 560- 568, 2002.

KOJDA, G.; HARRISON, D.G. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovascular Research**, 43, 562–71, 1999.

KOSAR, M., KAFKAS, E., PAYDAS, S., CAN BASER, K. H. Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(6), 1586–1589, 2004.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T.D. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. **The American Journal of Medicine**. 113 (9b): 71S-88S, 2002.

KUHNAU, J. The flavanoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World Review Nutrition and Diet**, 24, 117-191, 1976.

LAGO, E.S.; GOMES, E.; SILVA, R. Produção de geleia de jabolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico - químicos e avaliação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 26 (4), 847-852, 2006.

LANDMESSER, U.; HORNIG, B.; DREXLER, H. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia: mechanisms, pathophysiological importance, and therapeutic interventions. **Seminars in Thrombosis Hemostasis**, 26, 529 –37, 2000.

LARROSA, M.; TOMAZ-BARBERAN, F.A.; ESPÍN, J.C. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. **Journal Nutrition Biochemistry**, 17 (9), 611-625, 2006.

LAVINAS, F.C.; ALMEIDA, N.C.; MIGUEL, M.A.L.; LOPES, M.L.M.; VALENTE-MESQUITA, V.L. Estudo da Estabilidade química e

microbiológica do suco de caju in natura armazenado em diferentes condições de estocagem. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.26 (4), 875-883, 2006.

LEDOUX, S.P., DRIGGERS, W.J., HOLLENSWORTH, B.S.; WILSON, G.L. Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. **Mutation Research**, 434: 149–159, 1999.

LEE, C.Y. Effect of cultural practices on chemical composition of processing vegetables. A review. **Journal of Food Science**, 39: 1075–1079, 1974.

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

LIMA, M.A. **Conservação pós-colheita de goiaba e caracterização tecnológica dos frutos de diferentes genótipos, produzidos em Jaboticabal, SP**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 1999. 101 p.

LISTER, C.E.; LANCASTER, J.E.; SUTTON, K.H. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. **Journal of the Science and Food Agriculture**, 64: 155, 1994.

LOPES DA SILVA, F.; ESCRIBANO-BAILON, M.T.; PEREZ ALONSO, J.J.; RIVAS-GONZALO, J.C.; SANTOS-BUELGA, C. Anthocyanin pigments in strawberry. **Food Science and Technology**, 40 (2): 374-382, 2007.

LOPES, H.R.D. **A cultura do morangueiro no Distrito Federal**. Brasília, DF: Emater, 2005. 75p.

MAAS J.L.; GALLETTA G.J.; WANG S.Y. Ellagic acid enhancement in strawberries. In: Bills DD, Kung S-D, eds. **Biotechnology and Nutrition**. Storeham, USA: Butteworth-Heinemann, 345–362, 1992.

MAAS, J.L.; WANG, S.Y.; GALLETTA, G.J. Evaluation of strawberry cultivars for ellagic acid content. **HortScience**, 26(1): 66–68, 1991.

MAATTA-RIIHINEN, K.R.; KAMAL-ELDIN, A.; TORRONEN, R. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 6178-6187, 2004.

MACHEIX J-J, FLEURIET A., BILLOT J. **Fruit Phenolics**. Boca Raton, USA: CRC Press, 1990.

MACHEREY NAGEL. **Solid Phase Application Guide**. Disponível em: <http://www.macherey-nagel.com/tabid/10863/default.aspx>. Acesso em: 10 agosto 2008.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do CEPPA**, 24 (1), 59-82, 2006.

MANN, J. Secondary Metabolism. Clarendon Press, Oxford. p 316, 1978.

MARÇO, P.H.; POPPI, R.J.; SCARMINIO, I.S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, 31, (5): 1218-1223, 2008.

MARKO-VARGA, G.; BARCELO, D. Liquid chromatographic retention and separation of phenols and related aromatic compounds on reversed phase columns. **Chromatographia** 34, 146-154, 1992.

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutritión**, 50 (1), 5-18, 2000.

MARWAN, A.G.; NAGEL, C.W. Microbial inhibitors of cranberries. **Journal of Food Science**, 51: 1009–1013, 1986.

MATEOS, R.; LECUMBERRI, H.; RAMOS, S.; GOYA, L.; BRAVO, L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. **Journal of Chromatography B**, 827, 76–82, 2005.

MAZZA G, MINIATI E. Types of anthocyanins. In: **Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains**. In: Mazza G, Miniat, E, eds. Florida, CRC Press, 1-28, 1993.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, 36 (1): 1-11, 2002.

MELO, E.A.; LIMA, V.L. A.G.; NASCIMENTO, P.P. Temperatura no armazenamento de pitanga. **Scientia Agricola**, 57 (4): 629-634, 2000.

MEYER, A.S., DONOVAN, J.L., PEARSON, D.A., WATERHOUSE, A.L., FRANKEL, E.N. Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46: 1783-1787, 1998a.

MEYER, A.S., HEINONEN, M., FRANKEL, E.N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food Chemistry**, 61: 71-75, 1998b.

MIDDLETON E.J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, C.T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, 52: 673-751, 2000.

MINK P.J.; SCRAFFORD, C.G.; BARRAJ, L.M. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**. 85:895-909, 2007.

MONTEIRO, M.; AMARO, A.P.; BONILHA, P.R.M. Avaliação físico-química e microbiológica da polpa de maracujá processada e armazenada sob refrigeração. **Alimentos e Nutrição**, 16 (1) 71-76, 2005.

MORAES, P.C.B.T. **Avaliação de iogurtes líquidos comerciais sabor morango: estudo de consumidor e perfil sensorial**. Dissertação (mestrado). Campinas, Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2004, 121p.

MORENO, J.; CHIRALT, A.; ESCRICHE, I.; SERRA, J.A. Effect of blanching/osmotic dehydration combined methods on quality and stability of

minimally processed strawberries. **Food Research International**, 33: 609±616, 2000.

MOTA, R. Caracterização do suco de amora-preta elaborado em extrator caseiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26 (2) 303-308, 2006.

MOZAFAR, A. **Plant Vitamins: Agronomic, Physiological and Nutritional Aspects**; CRC Press: Boca Raton, FL, 1994.

MULLER, S.; KONIG, I.; MEYER, W.; KOJDA, G. Inhibition of vascular oxidative stress in hypercholesterolemia by eccentric isosorbide mononitrate **Journal of the American College of Cardiology**, 44: 624-631, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, 1054, 1-2, 95-111, 2004.

NASCIMENTO, J.R.; HIGUCHI, B.K.; GOMEZ, M.L.P.A.; OSHIRO, R.A.; LAJOLO, F.M. L-ascorbate biosynthesis in strawberries: L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase expression during fruit development and ripening, **Postharvest Biology and Technology**, 38: 34–42, 2005.

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

NATELLA, F.; BELELLI, F.; GENTILI, V. *et al.* Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 7720-7725, 2002.

NEPA – Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. **Tabela brasileira de composição de alimentos** / NEPA - UNICAMP. – Campinas: NEPA-UNICAMP, 2004. 42p.

NICOLI, M.C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. **Trends Food Science and Technology**, 10, 94–100, 1999.

NICOLI, M.C.; ANESE M.; PARPINEL M.T.; FRANCESCHI S.; LERICI C.R. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. **Cancer Letters**, 114,771–4, 1997.

NUNES, M.C.N.; BRECHT, J.K.; MORAIS, A.M.M.B.; SARGENT, S.A. Physical and chemical quality characteristics of strawberries after storage are reduced by a short delay to cooking. **Postharvest Biology and Technology**, 6: 17-28, 1995.

ODRIOZOLA-SERRANO, I.; HERNANDEZ-JOVER, T.; MARTIN-BELLOSO, O. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. **Food Chemistry** 105: 1151–1158, 2007.

OHARA Y, PETERSON TE, HARRISON DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. **Journal of Clinical Investigation**, 91, 2546 –51, 1993.

OLSSON, M.E., EKVALL, J., GUSTAVSSON, K.E., NILSSON, J., PILLAI, D., SJOHOLM, I., SVENSSON, U., AKESSON, B., NYMAN, M.G.L. Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): effects of cultivar, ripening, and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 2490–2498, 2004.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYIO, A. Comparative study of phenolic content and antioxidant activity of strawberry puree, clear, and cloudy juices. **European Food Research and Technology**, 228, 623–631, 2009.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.; DEEMER, E. K.; PRIOR, R. L.; HUANG, D. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 2772-2777, 2002.

OUGH, C.S.; AMERINE, M.A. **Methods for analysis of musts and wines**. New York. 377, 1988.

PASSOS, F. A.; TRANI, P.E. Hortaliças: Morango. In: RAIJ, B. van; CANTARELA, H.; QUAGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed.rev.atual. Campinas, Instituto Agrônômico/Fundação IAC, 1997. 285p. (Boletim Técnico, 100).

PATRAS, A.; BRUNTON N.P.; PIEVE, S.; BUTLER, F. Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid,

anthocyanin content and color of strawberry and blackberry purées. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2009, doi:10.1016/j.ifset.2008.12.004

PENTEADO, M. V. C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri, SP: Manole, 2003. 612 p.

PIETTA PG. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63 (7), 1035-42, 2000.

PILJAC-ZEGARAC, J.; VALEK, L.; MARTINEZ, S.; BELŠČAK, A. Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. **Food Chemistry**, 113, 394–400, 2009.

PINELI, L.L.O. **Caracterização física, química, sensorial e nutricional de batatas minimamente processadas**. Dissertação de mestrado. (Faculdade de Ciências da Saúde / Nutrição Humana / Universidade de Brasília). Brasília, 2005. 218p.

PINTO, M. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Strawberry Jams. **Plant Foods for Human Nutrition** (Dordrecht), 63: 127-131, 2007.

PINTO, M. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Chemistry**, 107: 1629-1635, 2008.

PRICE, K.R.; PRICE, C.S.C.; REYNOLDS, R.D. Hyperglycemia-induced ascorbic acid deficiency promotes endothelial dysfunction and the development of atherosclerosis. **Atherosclerosis** 158: 1–12, 2001.

PRICE, K.R.; PROSSER, T.; RICHETIN, A.M.F.; RHODES, M.J.C. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples: distribution within the fruit and effect of juicing, **Food Chemistry**, 66, 489–494, 1999.

PRIOR, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **American Journal of Clinical Nutrition**, 78, 570S–578S, 2003.

PRIOR, R.L.; WU, X.; GU, L.; HAGER, T.J.; HAGER, A.A.; HOWARD, L.R. Whole Berries versus Berry Anthocyanins: Interactions with Dietary Fat

Levels in the C57BL/6J Mouse Model of Obesity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56 (3), 647-653, 2008.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 3396-3402, 2000.

QADIR, A., HEWETT, E.W., LONG, P.G. Ethylene production by *Botrytis cinerea*. **Postharvest Biology and Technology**, 11, 85-91, 1997./

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; JUNG-MENDAÇOLLI, S.L.; PASSOS, F.A.; SANTOS, R.R. Caracterização botânica de cultivares de morangueiro. **Bragantia**, 55 (1), 29-44, 1996.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KIRKHAM, P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary Polyphenols. **Biochemical Pharmacology**, 72, 1439-1452, 2006.

RAHMAN, M.M.; KHAN, M.M.R.; HOSAIN, M.M. Analysis of Vitamin C (ascorbic acid) Contents in Various Fruits and Vegetables by UV-spectrophotometry. **Bangladesh Journal of Science and Industrial Research**, 42(4), 417-424, 2007.

RESENDE, L. M. A.; MASCARENHAS, M. H. T.; PAIVA, B. M. Panorama da produção e comercialização do morango. **Informe Agropecuário Minas Gerais**, 20 (198): 5-19, 1999.

RETSKY, K.L.; FREEMAN, M.W.; FREI, B. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. Anti- rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. **Journal of Biological Chemistry**, 268 (2):1304–1309, 1993.

REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grape. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 46: 4592-4597, 1998.

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

RICHTER, C., PARK, J.W.; AMES, B.N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. **Proceedings of the National Academy of Science**. USA 85, 6465–6467, 1988.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, 1000: 657–691, 2003.

ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M.K., TYLER, V.E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Baltimore, ed. Williams & Wilkins, 1996.

RUBBO, H., RADI, R., TRUJILLO, M., TELLERI, R., KALYANARAMAN, B., BARNES, S., KIRK, M. and FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **Journal of Biological Chemistry**, 269, 26066–26075, 1994.

RUFINO, M. S. M. ; ALVES, R. E. ; BRITO, E. S. ; MORAIS, S. M. ; SAMPAIO, C. G. ; Jimezes-Perez, J. ; Saura-Calixto, F.D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006 (Comunicado Técnico).

RUFINO, M. S. M. ; ALVES, R. E. ; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M. ; SAMPAIO, C. G. ; Jimezes-Perez, J. ; Saura-Calixto, F.D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007 (Comunicado Técnico).

SABINO, M; LAMARDO, L.C.A.; CERQUEIRA, E.; NAVAS, S.A.; INOMATA, E.I. **Vitaminas**. In: Odair Zenebon; Neus Sadocco Pascuet. (Org.). Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. IV ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 629-666, 2005.

SALEEM, M. HUSHEEM, P. HARKONEN PIHLAJA, K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of Terminalia chebula retz. fruit, **Journal of Ethnopharmacology**, 81: 327–336, 2002.

SALLES, J. R. J.; FARIAS. M. F.; SANTOS, F. A.; CHAGAS FILHO, E. Efeito do congelamento na conservação pós-colheita da acerola (*Mapighia glabra* L), armazenada sob condições de refrigeração. **Biblioteca de Saúde Pública**, 18(120):28-31, 2004.

SANHUEZA, R. M. V.; HOFFMAN, A.; ANTUNES, L. S. C.; FREIRE, J. M. **Sistema de Produção de Morango para Mesa na Região da Serra Gaúcha e Encosta Superior do Nordeste. Importância da cultura.** Sistema de Produção, 6 ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica Dez./2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MesaSerraGaucha/importancia.htm>. Acesso em 25/04/2006.

SANLI, N.; FONRODONA, G.; BARRÓN, D.; ÖZKAN, G.; BARBOSA, J. Prediction of chromatographic retention, pKa values and optimization of the separation of polyphenolic acids in strawberries. **Journal of Chromatography A**, 975: 299–309, 2002.

SANTOS, P. E. T. **Características básicas das principais cultivares de morango plantadas no Brasil.** Sistemas de produção, 5. Embrapa Clima Temperado. ISSN 1806-9207 Versão Eletrônica. Nov./2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap02.htm>. Acesso em 24/04/2006.

SANTOS, A. M. dos. **A cultura do Morango.** EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisas de Fruteiras de Clima Temperado - Fruteiras. *Coleção Plantar*, 7, 1993, 35 p.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento.** 6ed. Porto Alegre, Ed. da UFRGS; Florianópolis, Ed. da UFSC, 2007. 1104p.

SCALZO, J., POLITI, A., PELLEGRINI, N., MEZZETTI, B., BATTINO, M. (2005). Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. **Nutrition**, 21, 207–213, 2005.

SCHRAMM, D.; GERMAN, J. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 9, 560–566, 1998.

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

SEERAM, N. P; LEE, R.; SCHEULLER, H. S.; HEBER, D. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatographic analysis of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. **Food Chemistry**, 97, 1-11, 2006.

SELLAPPAN S, AKOH CC, KREWER G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 2432– 2438, 2002

SERDULA, M.K., BYERS, M.A.H., SIMOES, E., MENDLEIN, J.M. and COATES, R.J. The association between fruit and vegetable intake and chronic disease risk factors. **Epidemiology**, 7, 161–165, 1996.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 32, 1, 67-103, 1992.

SHAW, D.; LARSON, K. **Strawberry Plant named Camino Real**. United States Plant Patent Publication. Patent number: 2002/0152524 P1 Alexandria, 2002.

SHIN Y., LIU R.H., NOCKC, J.F.; HOLLIDAY D., WATKINS, C.B. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, 45, 349–357, 2007.

SHIN, Y.; RYU, J.; LIU, R.H.; NOCK, J.F.; WATKINS, C.B. Harvest maturity, storage temperature and relative humidity affect fruit quality, antioxidant contents and activity, and inhibition of cell proliferation of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 49, 201–209, 2008.

SIES, H. **Encyclopedia of Stress**, Vol. 3. Academic, San Diego, p. 102-105, 2000.

SILVA, V.L. ; COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de Micronutrientes - Vitamina C (ácido ascórbico). In: Silvia Maria Franciscato Cozzolino. (Org.). **Biodisponibilidade de Nutrientes** 2o. ed. revisada e atualizada. Barueri-SP: Editora Manole, 1: 305-324, 2007.

SILVA, M.R.; SANTOS JÚNIOR, R.T.O.; FERREIRA, C.C. Estabilidade da Vitamina C em cagaita in natura e durante a estocagem da polpa e refresco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 38 (1), 53-58, 2008.

SIMIRGIOTIS, M.J.; THEODULO, C.; CALIGARI, P.D.S.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Comparison of phenolic composition and antioxidant properties of two native Chilean and one domestic strawberry genotypes. **Food Chemistry**, 113, 377–385, 2009.

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

SINGLETON V L. Analytical fractionation of the phenolic substances of grapes and wine and some practical uses of such analyses. **American Chemical Society**, 137:184-211, 1974.

SKUPIEŃ, K.; OSZMIAŃSKI, J. Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. **European Food Research Technology**, 219, 66–70, 2004.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, 3, 229-235, 2000.

SOMERS, F.G.; BEESON, K.C. The influence of climate and fertilizer practices upon the vitamin and mineral content of vegetables. **Advanced Food Research**. 1, 291-324, 1948.

STADTMAN E.R.; LEVINE, R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, 25, 207–218, 2003.

STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E. Beyond cholesterol: Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. **New England Journal of Medicine**, 320, 915–924, 1989.

STEVENS, M.A., Varietal influence on nutritional value. In: White, P.L., Selvey, N. (Eds.). **Nutritional Qualities of Fresh Fruits and Vegetables**. Futura, Mt. Kisco, NY, 87–110, 1974.

STÖHR, H.; HERRMANN, K. The phenolics of fruits. VI. The phenolics of currants, gooseberries and blueberries. Changes in phenolic acids and catechins during development of black currants. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, 159: 31–37, 1975.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: P.M. Dey and J.B. Harbourne, Editors, **Plant Biochemistry**, Academic Press, San Diego, 387–416, 1997.

STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.C.; AMARAL, M.P.H.; CARVALHO, A.F.; VILELA, M.A.P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 43 (2), 181-194, 2007.

STRUBE, M.; DRAGSTED, L. O.; LARSEN, J. C. **Naturally occurring antitumorigens.I. Plant phenols**. Nordic Council of Ministers. Copenhagen; Nordiske Seminar-og Arbejdsrapporter, 605p.,1993.

STURM, K.; KORON, D.; STAMPAR, F. The composition of fruit of different strawberry varieties depending on maturity stage. **Food Chemistry**, 83 417–422, 2003.

SUDHEER, A.R., MUTHUKUMARAN, S., KALPANA, C., SRINIVASAN, M., MENON, V.P. Protective effect of ferulic acid on nicotine-induced DNA damage and cellular changes in cultured rat peripheral blood lymphocytes: a comparison with N-acetylcysteine. **Toxicology in Vitro** 21(4), 576–85, 2007a.

SUDHEER, A.R., MUTHUKUMARAN, S., DEVIPRIYA, N., MENON, V.P. Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: with the comparison of N-acetylcysteine. **Toxicology**, 230, 11–21, 2007b.

SUDHEER, A.R.; KALPANA, C.; SRINIVASAN, M.; MENON, V.P. Ferulic acid modulates altered lipid profiles and prooxidant/antioxidant status in circulation during nicotine-induced toxicity: a dose-dependent study, **Toxicology Mechanisms and Methods**, 15, 375–381, 2005.

TAMURA, H., TAKADA, M., YOSHIDA, Y. Pelargonidin 3-O-(6-Omalonyl-b-D-glucopyranoside) in *Fragaria x ananassa* Duch cv Nyoho. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 59: 1157–1158, 1995.

TAPIERO, H.; TEW, K.D.; BA, G.N.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 56, 4, 200-207, 2002.

TAVARES, J. C.; GÓIS, V. D.; BEZERRA NETO, F.; OLIVEIRA, M. J. A. Método de congelamento na conservação da acerola (*Malpighia Emarginata* DC.). **Caatinga**, Mossoró-RN, 11(1/2): 71-74, 1998.

THAIPONG K, BOONPRAKOB U, CROSBY K, CISNEROS-ZEVALLOS L, BYRNE DH Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of the Food Composition Analysis**, 19, 669-675, 2006.

THULSTRUP, P.W.; THORMANN, T.; SPANGETLARSEN, J.; BISGAARD, H.C. Interaction between ellagic acid and calf thymus DNA studied with flow linear dichorism UV–vis spectroscopy, **Biochemical and Biophysical Research Community**. 265, 416–421, 1999.

TIWARI, B. K., O'DONNELL, C. P., PATRAS, A., BRUNTON, N. P., CULLEN, P. J. Effect of ozone processing on anthocyanins and ascorbic acid degradation of strawberry juice. **Food Chemistry**, 113, (4), 1119-1126, 2009a.

TIWARI, B. K., O'DONNELL, C. P., PATRAS, A., BRUNTON, N. P., CULLEN, P. J. Stability of anthocyanins and ascorbic acid in sonicated strawberry juice during storage. **European Food Research and Technology**, 228, (5), 717-724, 2009b.

TOMÁS-LORENTE, F.; GARCÍA-VIGUERA, C. FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Phenolic compounds analysis in the determination of fruit jam genuineness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, 1800–1804, 1992.

TORRONEN, R. HAKKINEN, S.; KARENLAMPI, S.; MYKKANEN, H. Flavonoids and phenolic acids in selected berries. **Cancer Letters** 114, 191-192, 1997.

TOURNAS; V.H.; KATSODAS, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits, **International Journal of Food Microbiology**, 105, 11–17, 2005.

TULIPANI, S.; MEZZETTI, B.; CAPOCASA, F.; BOMPADRE, S.; BEEKWILDER, RIC DE VOS, J.C.H.; CAPANOGLU, E.; BOVY, A.; BATTINO, M. Antioxidants, Phenolic Compounds, and Nutritional Quality of Different Strawberry Genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 696–704, 2008.

TURA, D.; ROBARDS, K. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. **Journal of Chromatography A**, 975, 71–93, 2002.

VALKONEN, M.M; KUSSE, T. Vitamin C prevents the acute atherogenic effects of passive smoking. **Free Radical Biology Medicine**, 28, 428–436, 2000.

VASCO, C.; RIIHINEN, K.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Phenolic Compounds in Rosaceae Fruits from Ecuador. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, DOI: 10.1021/jf802656r, 2009.

VASCONCELOS, S.M.L. ; GOULART, M.O.F. ; MOURA ; MANFREDINI, V.; KUBOTA, L. T. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 30, 1323-1338, 2007.

VATTEM D.A.; SHETTY K. Biological functionality of ellagic acid: a review. **Journal of Food Biochemistry**, 29, 234–266, 2005.

VEDANA, M.I.S. **Efeito do processamento na atividade antioxidante de uva**. Dissertação de mestrado (Tecnologia de Alimentos / Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos / Universidade Federal do Paraná). Curitiba, 2008. 87p.

VENDRUSCOLO, J. L.; VENDRUSCOLO, C. T. **Conservação de morango para elaboração de produtos industrializados**. Sistemas de produção. No. 5 (novembro de 2005) Disponível em: [URL:http://sistemas de](http://sistemas de)

produção.cnptia.embrapa.br/Fontes_HTML/Morango/SistemaProducao_Morango/cap14.htm.ISSN1806-9207

VÍCTOR, V. M.; DE LA FUENTE, M. Several functions of immune cells in mice changed by oxidative stress caused by endotoxin. **Physiology Research**, 52, 789-796, 2003.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M.R.N. Ordem Rosales. Família Rosaceae. In: ____ **Taxonomia Vegetal** (Caderno Didático 57, Departamento de Biologia Vegetal). Viçosa, Editora UFV, 2003. 89 p.

WALMSLEY, A.R., BATTEN, M.R., LAD, U., BULLEID, N.J. Intracellular retention of procollagen within the endoplasmic reticulum is mediated by prolyl 4-hydroxylase. **Journal of Biological Chemistry**, 274, 14884–14892, 1999.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Compost as a soil supplement increases the level of antioxidant compounds and oxygen radical absorbance capacity in strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 6844-6850, 2003.

WANG, S.Y.; ZHENG, W. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49 4977–4982, 2001.

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

WANG, S.Y., ZHENG, W., GALLETTA, G.J. Cultural system affects quality and antioxidant capacity in strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 6534–6542, 2002.

WANG, S.Y.; BUNCE, J.A.; MAAS, J.L. Elevated carbon dioxide increases contents of antioxidant compounds in field-grown strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51 4315–4320, 2003.

WEN, Y.; COOKE, T.; FEELY, J. The effect of pharmacological supplementation with vitamin C on low-density lipoprotein oxidation. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 44: 94–97, 1997.

WESTON, L.A., BARTH, M.M. Preharvest factors affecting postharvest quality of vegetables. **HortScience**, 32, 812– 816, 1997.

WHITLEY, A.C.; STONER, G.D.; DARBY, M.V.; WALLE, T. Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid – extensive binding to protein and DNA. **Biochemical Pharmacology**, 66, 907–915, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION .WHO. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. (**WHO Technical Report Series, 916**).Geneva. 149 p. 2003. Disponível em: <[http:// whqlibdoc.who.int/trs/who_TRS_916.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/who_TRS_916.pdf)>. Acesso em: 30 outubro 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION .WHO. **Global strategy on diet, physical activity and health: fiftyseventh World Health Assembly Wha 57.17. 22** May 2004. Disponível em: <www.who.int>. Acesso em: 12 dez. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION .WHO. **10 facts on the global burden of disease. Cardiovascular diseases are the leading causes of death in the world.** Disponível: http://www.who.int/features/factfiles/global_burden/facts/en/index1.html. Acesso em 12 dezembro 2008.

WICKLUND, T.; ROSENFELD, H. J.; MARTINSEN, B. K.; SUNDFOR, M. W.; LEA, P.; BRUUN, T.; BLOMHOFF, R.; HAFFNER, K. Antioxidant capacity and color of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. **Food Science and technology**, 38, 387-391, 2005.

WILLS, R.B.H., Enhancement of senescence in nonclimacteric fruit and vegetables by low ethylene levels. **Acta Horticulturae**, 464, 159 - 162, 1998.

WINTERGERST E, MAGGINI S, HORNIG D. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. **Annual Nutrition Metabolism**, 50 (2), 85–94, 2006.

WRIGHT, W.R., BILLETER, B. A. Marketing losses in selected fruits and vegetables at wholesale, retail, and consumer levels in the Chicago area. **USDA Marketing Research Report No. 1017**, 1975.

YEOMANS, V.C.; LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Interactive effects of polyphenols, tocopherol and ascorbic acid on the Cu(2+)-mediated oxidative

modification of human low density lipoproteins. **European Journal of Nutrition**, 44: 422–428, 2005.

YU, T.Y.; CHANG, W.; WU, C.; CHIANG, S. Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 16, 675–681, 2005.

ZHANG, D., QUANTICK, P.C. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 73, 763–767, 1998.

ZHANG, Y.; VAREED, S.K.; NAIR, M.G. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables, **Life Sciences**, 76, 1465–1472, 2005.

ZHANG, H.; ZHENG, X.; WANG, L.; LI, S.; LIU, R. Effect of yeast antagonist in combination with hot water dips on postharvest *Rhizopus* rot of strawberries, **Journal of Food Engineering**, 78, 281–287, 2007.

ZHENG, Y.; WANG, S. Y., WANG, C. Y., ZHENG, W. Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity response to high oxygen treatments. **Food Science and Technology**, 40 (1), 49-57, 2007.

ZWART, L. L., MEERMAN, J. H. W., COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Biomarkers of free radical damage. Applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology Medicine**, 26, 202–206, 1999.

CAPÍTULO 2 - HIPÓTESE, OBJETIVOS, MATERIAL E MÉTODO DE PESQUISA

O presente capítulo tem por objetivo delimitar a hipótese da pesquisa e os objetivos, bem como descrever o material e os métodos utilizados para que estes sejam alcançados. Os protocolos detalhados das análises realizadas são apresentados no final do trabalho, na forma de anexos.

2.1 HIPÓTESE DA PESQUISA

Os fatores genéticos, pré e pós-colheita, o estágio de maturação e as operações unitárias utilizadas no processamento do morango afetam as características físicas, químicas, os conteúdos de compostos bioativos e, conseqüentemente, o potencial antioxidante *in vitro* dos frutos e produtos derivados.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

É objetivo geral deste estudo caracterizar a qualidade, o perfil de substâncias bioativas e a atividade antioxidante, *in vitro*, de morangos cultivados em Brazlândia – DF, e dos principais produtos derivados, visando à agregação de valor e à diversificação do setor agroindustrial, com foco na saúde do consumidor.

2.2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar física, química e sensorialmente morangos ‘Osogrande’ e ‘Camino Real’, armazenados em diferentes temperaturas de armazenamento.
- Avaliar as diferenças de composição e atividade, *in vitro*, de antioxidantes de morangos em diferentes estágios de maturação.

- Avaliar os efeitos do processamento de polpa congelada e de geleia de morangos ‘Camino Real’ nas características físicas, químicas, nas concentrações dos compostos bioativos e no potencial antioxidante *in vitro*.
- Avaliar a relação entre o potencial antioxidante *in vitro* e as demais variáveis analisadas.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Experimento 1: Caracterização física, química e sensorial de morangos ‘Osogrande’ e ‘Camino Real’ em diferentes estágios de maturação

Morangos ‘Osogrande’ e ‘Camino Real’ foram colhidos pela manhã (Figura 1a) em Brazlândia, DF. Após a seleção realizada pelos funcionários da produção (Figura 1b), os frutos foram embalados (Figura 1c) e transportados para o Laboratório de Pós-colheita da Embrapa Hortaliças.



Figura 1. (a) Colheita e (b) seleção e (c) embalagem de morangos ‘Osogrande’ e ‘Camino Real’. Brazlândia – DF, abril de 2008.

O material foi reclassificado quanto ao estágio de maturação e os morangos nos estágios $\frac{1}{2}$ maduro (verde), $\frac{3}{4}$ maduro (“rosados” ou maturação comercial), e maduro (vermelhos) foram congelados em *ultrafreezer* até o momento das análises de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, vitamina C total, fenólicos totais e antocianinas totais.

2.3.2 Experimento 2: Caracterização física, química e sensorial de morangos 'Osogrande' e 'Camino Real' $\frac{3}{4}$ maduros armazenados a 5 e a 15°C

Morangos 'Osogrande' e 'Camino Real' foram colhidos pela manhã no município de Brazlândia, DF, e levados sob refrigeração para o Laboratório de Pós-Colheita da Embrapa Hortaliças. Após seleção, morangos no estágio de maturação $\frac{3}{4}$ maduro foram acondicionados em bandejas de PET cristal e armazenados em câmaras frias a 5 e 15°C e 80% UR (Figura 2). As análises dos frutos foram realizadas a cada dois dias, durante 8 dias. Foram analisados a qualidade sensorial global, a perda de massa, a firmeza, a colorimetria (tonalidade, saturação e luminosidade), a acidez total titulável, o teor de sólidos solúveis totais, o pH, o teor de vitamina C total, o de fenólicos totais, o de antocianinas totais, o de ácido elágico total e o potencial antioxidante por DPPH e FRAP.



Figura 2 Unidades experimentais de morango durante o armazenamento refrigerado.

2.3.3 Experimento 3: Caracterização física e química de polpa congelada e geleia de morango cv. Camino Real, armazenadas por 120 dias

2.3.3.1 Processamento de polpa congelada de morango

Morangos cv. 'Camino Real' foram coletados no Município de Brazlândia, DF, e transportado em caminhão refrigerado para o Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Vegetal, das Faculdades Integradas da Terra de Brasília. Os frutos foram selecionados, higienizados e sanitizados em solução de 150mg de cloro ativo.L⁻¹ por 5 minutos (Figura 3a). O suco foi extraído em despoldadeira industrial (Figura 3b), embalado em polietileno (Figura 3c) e congelado em *freezer* a -18°C (Figura 3d).



Figura 3 Processamento de polpa congelada: (a) sanitização; (b) despoldagem; (c) selamento da embalagem e (d) congelamento

O produto foi armazenado por 120 dias. A cada trinta dias, foram retiradas amostras para as análises de acidez total titulável, umidade, colorimetria (tonalidade, saturação e luminosidade), teor de vitamina C total, de

fenólicos totais, de antocianinas totais, de ácido elágico total, e potencial antioxidante por DPPH e FRAP.

2.3.3.2. Processamento de geleia de morango

Morangos cv. 'Camino Real' foram coletados no Município de Brazlândia, DF, e transportados em caminhão refrigerado para o Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Católica de Brasília. Os frutos foram selecionados, sanitizados em solução de 150mg de Cloro ativo.L⁻¹ por 5 minutos, cortados em 16 partes iguais (Figura 4a) e acondicionados em sacos dentro de caixas de isopor com gelo. Os frutos foram transportados para a unidade agroindustrial da empresa Laticínios Araguaia, localizada no Núcleo Rural Monjolo, no Recanto das Emas-DF, onde foram processados em tacho encamisado com circulação de vapor (pressão manométrica de 3 a 3,5 atm) e capacidade de 300kg. Aos frutos foi adicionado açúcar refinado, equivalente a 75% da massa picada (Figura 4b). Após uma hora de desidratação osmótica, o produto foi concentrado, sob agitação constante, até 66°Brix de sólidos solúveis totais (Figura 4c), e acondicionado a quente em potes de vidro de 250g, previamente sanitizados. Após rosqueamento da tampa, a embalagem foi invertida por 15 minutos para esterilização completa do interior. O produto foi armazenado em câmara a 20°C e ao abrigo da luz, no laboratório de Pós-colheita da Embrapa Hortaliças, por 120 dias (Figura 4d).



Figura 4 Processamento de geleia: (a) corte; (b) desidratação osmótica do morango com açúcar; (c) concentração e (d) produto embalado.

A cada trinta dias, foram retiradas amostras para as análises de acidez total titulável, umidade, colorimetria (tonalidade, saturação e luminosidade), teor de vitamina C total, de fenólicos totais, de antocianinas totais, de ácido elágico total e potencial antioxidante por DPPH e FRAP.

2.3.4. Determinações analíticas

As análises de umidade, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, vitamina C total, fenólicos totais, antocianinas totais, ácido elágico total, e potencial antioxidante *in vitro* por DPPH e FRAP foram realizadas no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Católica de Brasília. As análises de colorimetria e firmeza, além das análises de perda de massa e análise sensorial, foram executadas no Laboratório de Pós-colheita da Embrapa Hortaliças. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.4.1 Análise de perda de massa

A perda de massa foi determinada pela pesagem das bandejas no tempo inicial e no correspondente ao tratamento (2, 4, 6 e 8 dias de armazenamento) e calculada por aplicação da fórmula:

$PM = (P_i - P_f) * 100 / P_i$, em que:

PM = perda de massa

P_i = peso da bandeja no tempo inicial (0 dia)

P_f = peso da bandeja no tempo do tratamento (2, 4, 6, ou 8 dias)

2.3.4.2 Análise sensorial

A análise sensorial foi feita de acordo com método proposto por Shin *et al.* (2007). Os morangos foram distribuídos em bandejas de isopor e analisados por 5 provadores treinados, que avaliavam a superfície dos frutos e atribuíam notas de acordo com a escala de qualidade global abaixo:

- 1 – inaceitável (> 50% da superfície mostrando injúria ou descoloração)
- 2 – ruim (20-50% da superfície afetada)
- 3 – aceitável (5-20% da superfície afetada)
- 4 – bom (até 5% de superfície afetada)
- 5 – excelente (sem injúrias ou descolorações)

As notas eram posteriormente submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de comparação de médias de Fischer – dms (diferença mínima significativa) com nível de significância (α) de 5%. Posteriormente eram contados os frutos com crescimento fúngico visível e assim determinados os percentuais de frutos com deterioração visível.

O modelo da ficha de avaliação sensorial encontra-se no **ANEXO 1**.

2.3.4.3 Análise colorimétrica

A cor de três morangos cada unidade experimental foi medida em duplicata na região equatorial, utilizando-se colorímetro MINOLTA CR[®] 400 b (MINOLTA, 1994), configurado no esquema colorimétrico L*, a* b*, conforme ilustrado na Figura 18.

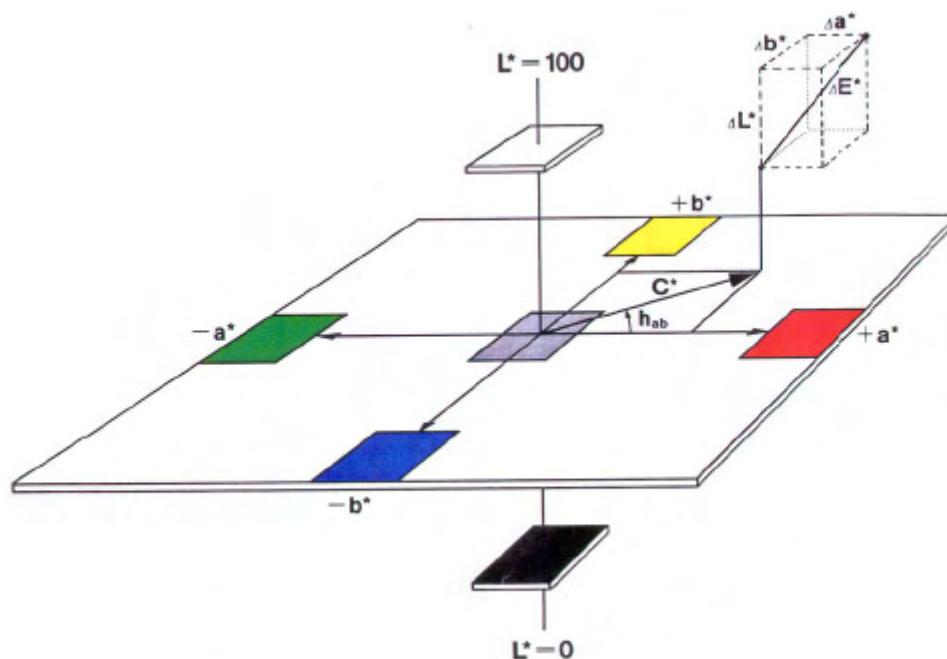


Figura 5 Esquema colorimétrico CIE LAB (CIE, 1976)

As medidas foram expressas em termos de croma ou saturação (intensidade da cor), ângulo hue ou tonalidade (cor verdadeira ou vermelhidão) e valor L* ou luminosidade.

A saturação e a tonalidade são calculadas por meio das fórmulas:

$$\text{Saturação} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$\text{Tonalidade} = \arctan (b^*/a^*).$$

A classificação da tonalidade foi feita de acordo com a escala apresentada por McGuire, (1992) 0 = vermelho-púrpura; 90 = amarelo; 180 = verde-azulado; 270 = azul.

2.3.4.4 Análise de firmeza

A firmeza foi determinada utilizando-se penetrômetro SAMMAR Ltda[®] ponta de prova de 8,0 mm de diâmetro; os resultados foram expressos em Newtons (N).

2.3.4.5 Análise de umidade

Os métodos oficiais para determinar o conteúdo de umidade de frutos e hortaliças são baseados na evaporação da água, a partir de uma amostra de peso conhecido, por aquecimento a temperaturas relativamente baixas, usualmente não superiores a 70°C, num forno a vácuo, por 6 horas ou até que não haja futura perda de peso. Os fornos a vácuo e a baixas temperaturas são usados a fim de evitar escurecimento e perda de componentes além da água. O peso do material residual indica o ST, enquanto que o material volatilizado é assumido ser apenas umidade.

A análise de umidade dos frutos *in natura* foi realizada pelo método da estufa a 105°C até peso constante. Já a análise de polpa e geleia foi conduzida em estufa a vácuo (70°C), seguindo os mesmos procedimentos gravimétricos.

O protocolo utilizado encontra-se no **ANEXO 2**.

2.3.4.6 Análise de acidez total titulável

A acidez total titulável foi determinada pelo método potenciométrico. Esse método baseia-se na titulação dos ácidos orgânicos presentes da amostra com solução de hidróxido de sódio até o pH 8,2, em que se estabelece o equilíbrio estequiométrico entre os ácidos e a base.

Uma amostra de 6g de polpa de morango espremida em dessorador de *nylon* foi adicionada a um balão de 50mL, que foi completado com água destilada. O conteúdo foi transferido para um béquer. A acidez titulável do produto foi mensurada, usando-se o método de titulação em pH 8,2 com 0,1N NaOH, com auxílio de um pHmetro HI8014 (Hanna Instruments). Os resultados foram expressos em miliequivalentes de ácido cítrico.kg⁻¹ de polpa de morango.

O protocolo utilizado encontra-se no **ANEXO 3**.

2.3.4.7 Análise de sólidos solúveis totais

Para fins de controle de qualidade, o teor de sólidos solúveis totais é, usualmente, o valor obtido pelo uso de um refratômetro convertido para uma escala de sólidos solúveis, assumindo-se que esses consistem inteiramente de sacarose.

A determinação dos sólidos solúveis, quando feita com o uso de um refratômetro tipo Abbé ou manual, é um excelente exemplo de como devem ser as análises de controle de qualidade. O procedimento completo consiste em misturar e homogeneizar completamente a amostra, colocar uma ou duas gotas da mistura no refratômetro e ler o resultado.

Para produtos que não contêm grande quantidade de sólidos suspensos, os resultados são altamente precisos e muito significativos. Na maioria dos casos, eles refletem a doçura do produto que, assim, indica maturidade ou amadurecimento.

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado utilizando-se refratômetro de mesa modelo QUIMIS®; os resultados foram expressos em °Brix.

2.3.4.8 Análise de vitamina C total

Foi determinada segundo metodologia descrita por Terada *et al* (1979), modificada por Nunes *et al*. (1995), com análise realizada em triplicata.

O método de dinitrofenilhidrazina (DNPH) é padrão para a determinação de ácido ascórbico (AA) em materiais biológicos, funcionando bem na faixa de 5 a 40 µg (> 5 mg/100 g). Nesta metodologia, o AA é oxidado a osazone pelo DNPH em uma solução diluída de ácido sulfúrico, durante 3 horas de incubação a 60°C:

DCPIP pH↓ DNPH

AA → dehidroascorbato → ácido 2,3 dicetogulônico → osazone

O ácido metafosfórico (HPO_3) é um quelante que estabiliza o AA, impedindo a sua oxidação além de ácido 2,3 dicetogulônico. Tioureia é um agente redutor que impede que oxidantes como Fe^{3+} e H_2O_2 interfiram na coloração final. H_2SO_4 90% primeiro dissolve os osazones dos interferentes como glicose, frutose e arabinose e depois provoca o desaparecimento da cor, reduzindo ou removendo a interferência:

DNPH/calor H_2SO_4

Glicose → osazone → dissolução do osazone

Dois gramas de tecido fresco foram pesados e misturados com 18 mL de mistura ácida, centrifugados a 15.000 rpm por 20 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante foi filtrado. Foi pipetado 1 mL e adicionaram-se a esse volume 5 microlitros de 2,6 diclorofenolindofenol 0,2%, e em seguida agitou-se e incubou-se à temperatura ambiente por uma hora. Adicionou-se então 1 mL de tiouréia 2% e agitou-se bem. Foram adicionados 0,5 mL de dinitrofenilhidrazina 2% (exceto no branco), misturou-se e deixou-se em banho-maria por três horas, a 60 °C, exceto o branco. Colocou-se em banho de gelo e adicionaram-se cuidadosamente 2,5 mL de H_2SO_4 gelado (inclusive no branco) e agitou-se. Adicionou-se 0,5 mL de dinitrofenilhidrazina 2% ao branco e agitou-se. Foi efetuada leitura na absorvância a 540 nm à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico . kg^{-1} de polpa de morango.

O protocolo com detalhes encontra-se no **ANEXO 4**.

2.3.4.9 Análise de fenólicos totais

Este método é baseado na capacidade de os compostos fenólicos reduzirem uma mistura dos ácidos fosfotungstíco e fosfomolibdico, presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, em óxidos de tungstênio e de molibdênio, de cor azul, com absorvância máxima de 765nm.

Originalmente desenvolvido para análise de compostos fenólicos em vinhos, após as modificações realizadas por Singleton e Rossi (1965), a

utilização da técnica foi expandida para outras matrizes alimentícias, demandando, para tanto, o prévio preparo de um extrato.

Foram pesados 10 g de morango congelado, que se homogeneizaram com 100 mL de acetona 80%. Filtrou-se o preparado com papel filtro nº1 em funil de vidro. Rotaevaporou-se por cerca de 20 a 30min, a 40°C. A amostra foi transferida para tubo cônico e liofilizada. Completou-se o volume final para 10 mL com água destilada em balão volumétrico. Para análise foram pipetados em tubo de ensaio 0,2 mL do extrato diluído (5 microlitros de extrato e 195 microlitros de água) e 1mL de reagente de Folin e Ciocalteau 1:10 em água destilada. Agitou-se e em seguida os tubos permaneceram em repouso por 1 minuto. Adicionou-se 0,8mL de solução de carbonato de sódio 7,5% e as amostras foram incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A absorvância da mistura foi lida em espectrofotômetro a 765nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg.kg^{-1} MF).

O protocolo detalhado para a determinação dos fenólicos totais encontra-se no **ANEXO 5**.

2.3.4.10 Análise de antocianinas totais

Os métodos para análise de antocianinas requerem extração prévia das antocianinas da matriz alimentícia. As antocianinas, em pH baixo, encontram-se predominantemente na forma de cátion flavílio, o qual apresenta coloração vermelha em solução aquosa. Em pH alto, esse cátion é convertido em outras espécies incolores (MALACRIDA e MOTA, 2006; REVILLA *et al.*, 1998). O fato de o cátion flavílio ser estável em pH ácido levou à utilização de solventes contendo ácidos orgânicos ou minerais na extração de antocianinas de frutas e vegetais (MACHEIX, *et al.*, 1990).

No caso de sucos de frutas e vegetais, a preparação das amostras é realizada por diluição com álcoois acidificados, seguida ou não de filtração (FRANCIS, 1982). Em vegetais e frutas frescas poucos compostos são capazes de absorver energia na região de absorção máxima das antocianinas (465 a 550 nm). Assim sendo, a quantificação de antocianinas é realizada por métodos espectrofotométricos baseados em medições simples de absorvância

em comprimentos de onda adequados (WROLSTAD, 1976; JACKMAN *et al.*, 1987; JACKMAN e SMITH, 1996).

Uma porção de 1g de morango congelado foi pesada e diluída 20 vezes com solução metanólica com 0,5% de HCl. A mistura foi triturada num homogeneizador de amostras Ultraturrac T102E e centrifugada a 17600 **g** por 15 minutos e a 4°C. A absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 515 nm.

O resultado final foi expresso em mg de antocianinas totais em equivalentes de pelargonidina-3-glicosídeo . kg⁻¹ MF.

O protocolo utilizado encontra-se no **ANEXO 6**.

2.3.4.11 Análise de ácido elágico total

De acordo com Clifford e Scalbert (2000) a detecção e quantificação de elagitaninos são baseadas no conhecimento de que, quando esses compostos são expostos a ácidos ou bases, as ligações éster são hidrolisadas e o ácido hexahidroxi-difênico rearranja-se, espontaneamente, em ácido elágico solúvel em água. O tempo, a temperatura e o tipo e concentração de ácido usados na hidrólise interferem nos resultados analíticos. Pinto *et al.* (2008), após testarem várias combinações de reagentes, tempo e temperatura, estabeleceram o melhor procedimento de quantificação de ácido elágico total em morangos.

Pesou-se 0,5g de morango liofilizado, sobre o qual se adicionaram 50mL de solução de acetona 80%. A extração foi feita com auxílio de homogeneizador Ultraturrac 102 E por aproximadamente 1 minuto. A mistura ficou em repouso a 4°C, fechada e ao abrigo da luz, por 1 hora, quando foi, então, filtrada a vácuo. O resíduo foi extraído mais duas vezes com porções de 25 mL de acetona 80%. Os filtrados das 3 etapas de extração foram reunidos e uma alíquota de 2mL foi pipetada para balão de rotaevaporação. O solvente desta alíquota foi evaporado com nitrogênio gasoso e 2mL de TFA 2N foram adicionados ao balão, o qual foi levado para banho-maria com glicerina a 120°C, para hidrólise dos taninos, por uma hora. Após esse período, a amostra foi rotaevaporada a 95°C e ressuspendida com 1mL de metanol. A amostra foi guardada dentro de um tubo *ependorf* no *ultrafreezer* até o dia da análise.

Antes de ser analisada a amostra foi descongelada, filtrada em PTFE hidrofílico Millipore 0,22 micrômetros. Para análise em CLAE foram utilizados solventes água:tetrahidrofurano:ácido trifluoracético 98:2:0,1 (A) e acetonitrila (B), obedecendo ao seguinte gradiente: 0 a 2 min - 17% B, 2 a 7 min - 25% B, 7 a 15 min- 35%B, 15 a 20min- 50%B, 20 a 25min- 90% B, 25 a 45min- 17% B. Para confirmação das substâncias identificadas, algumas amostras foram analisadas em cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diodos (DAD - Shimadzu, SPD-M10A DAD, Germany) para obtenção dos espectros de absorção UV- Visível.

O protocolo, adaptado de Pinto *et al.* (2008), encontra-se no **ANEXO 7**.

2.3.4.12 Análise do potencial antioxidante *in vitro* por DPPH

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995) é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1- picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm.

O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (Fig. 20).

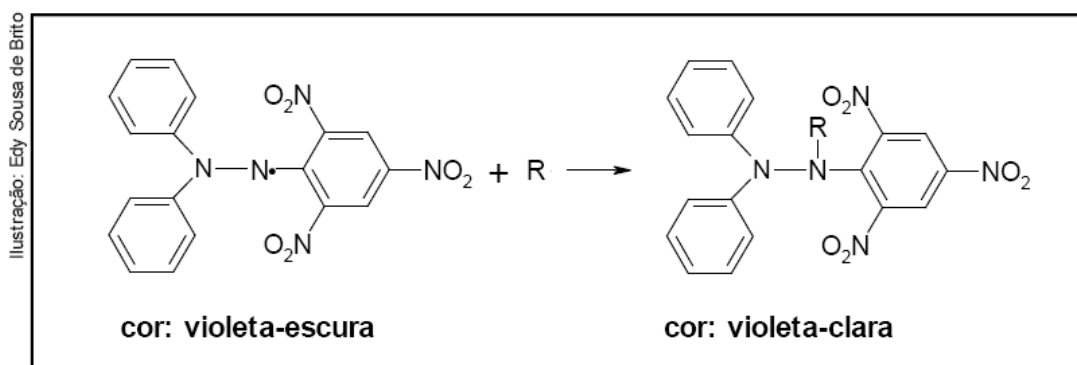


Figura 6 Estabilização do radical livre DPPH· pelo antioxidante R (RUFINO *et al.*, 2007).

Segundo Brand-Willians *et al.* (1995), a atividade anti-radical é definida como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH· em 50% (*Efficient Concentration* = EC₅₀, (mol/L antioxidante) / (mol/L DPPH·).

Para esta análise o mesmo extrato obtido para determinação do teor de fenólicos totais foi utilizado.

Uma alíquota de 0,1 mL do extrato previamente diluído nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL foi misturada com 3,9mL de solução de DPPH (0,06mM) e colocada ao abrigo da luz, em banho Maria a 25°C, por 25 minutos. Após a incubação, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 517nm, usando metanol como branco e uma solução metanólica de BHT em cinco concentrações diferentes (entre 200 e 25mg/mL) como controle. A atividade antioxidante total foi expressa em μmol de BHT equivalente/g polpa de morango.

O protocolo utilizado, elaborado originalmente por Rufino *et al.* (2007), encontra-se no **ANEXO 8**.

2.3.4.13 Análise do potencial antioxidante *in vitro* por FRAP

O procedimento analítico consiste na construção de duas curvas-padrão. A primeira é resultante da ação antioxidante de sulfato ferroso em diferentes concentrações sobre o TPTZ, por uma determinada condição de tempo e temperatura (Figura 22). Sob a mesma condição, posteriormente, diferentes concentrações de extrato da fruta atuam sobre a mesma quantidade de TPTZ. Para calcular a atividade antioxidante total, deve-se substituir na equação da segunda curva, a absorbância equivalente a 1.000 μM do padrão sulfato ferroso.

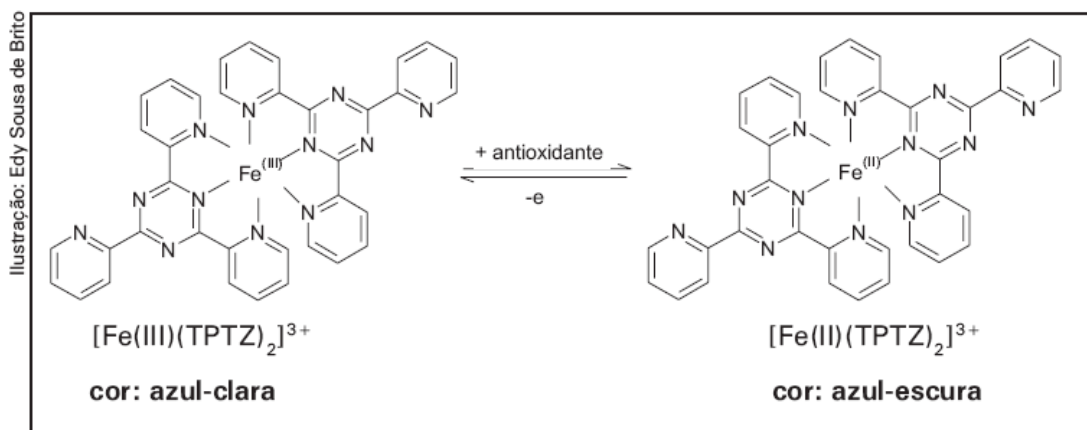


Figura 7 Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} (RUFINO *et al.*, 2006)

Para esta análise foi utilizado o mesmo extrato obtido para determinação do teor de fenólicos totais. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 90 μL de cada diluição do extrato (40, 20 e 10 mg/mL) para tubos de ensaio, acrescentaram-se 270 μL de água destilada, misturou-se com 2,7 mL do reagente FRAP, homogeneizou-se em agitador de tubos e estes foram mantidos em banho-maria a 37°C . Realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (595 nm) após 30 minutos de preparada a mistura e utilizou-se o reagente FRAP como branco para calibrar o espectrofotômetro. Procedimento idêntico foi realizado com solução de sulfato ferroso nas concentrações de 500 a 2000 μM no lugar do extrato. O resultado foi expresso em μM sulfato ferroso/g de fruta

O protocolo utilizado encontra-se no **ANEXO 9**.

2.3.5. Análise estatística

2.3.5.1 Experimento 1

O delineamento experimental do experimento 1 foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos provenientes do esquema fatorial 2×3 (2 cultivares – Osogrande e Camino Real, e 3 estágios de maturação – $\frac{1}{2}$ maduro ou verde, $\frac{3}{4}$ maduro ou rosado ou maturação comercial, e maduro ou

vermelho). A unidade experimental era composta por uma embalagem de 300 \pm 10 gramas de morangos. Os dados foram submetidos à Análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Fischer – dms (diferença mínima significativa, $p \leq 0,05$).

2.3.5.2. Experimento 2

Para o experimento 2, o delineamento foi inteiramente casualizado, com 20 tratamentos provenientes de um esquema fatorial 2 x 2 x 5 (2 cultivares – Osogrande e Camino Real, 2 temperaturas de armazenamento – 5 e 15°C, 5 tempos de armazenamento- 0, 2, 4, 6, e 8 dias), com 3 repetições. A unidade experimental correspondeu a uma embalagem de 300 \pm 10 gramas de morangos. Os dados foram submetidos à Análise de Variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Fischer da diferença mínima significativa ($p \leq 0,05$). Adicionalmente, para resumo e visualização da estrutura dos dados descritos com obtenção da correlação entre as variáveis dependentes foi realizada a Análise de Componentes Principais (ACP), utilizando-se o Programa XLSTAT (ADDINSOFT, 2008). Essa análise permite transformar um conjunto de variáveis originais, intercorrelacionadas, num novo conjunto de variáveis não correlacionadas, as componentes principais. O objetivo mais imediato da ACP é verificar se existe um pequeno número das primeiras componentes principais que seja responsável por explicar uma proporção elevada da variação total associada ao conjunto original, encontrando-se uma transformação mais representativa e mais compacta das observações (HATCHER e STEPANSKI, 1994). No mesmo programa, a Análise de Cluster Hierárquica foi realizada para agrupamento de tratamentos que apresentaram comportamentos similares e diferenciação de tratamentos com comportamentos dissimilares.

2.3.5.3. Experimento 3

O experimento 3 foi subdividido em 2 experimentos, de processamento de polpa e de geleia. Ambos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, constituídos cada um por 6 tratamentos (controle ou matéria–

prima e produto processado, armazenado em 0, 30, 60, 90 e 120 dias) com 3 repetições. As unidades experimentais dos controles eram constituídas por bandejas de 300±10 gramas de morangos maduros. As unidades de produtos processados eram constituídas por uma embalagem de 100g de polpa congelada ou por um pote de 250g de geleia de morango. Os dados de cada experimento foram tratados em três etapas: na primeira, avaliou-se a diferença entre as matérias-primas processadas, na segunda, o efeito do processamento (controle x produto processado no tempo inicial) e na terceira, o efeito do armazenamento (produto processado nos diferentes tempos de 0 a 120 dias). Os dados foram submetidos à Análise de Variância e as médias foram comparadas pelo teste da diferença mínima significativa ($p \leq 0,05$). A Análise de Componentes Principais e a Análise de Cluster Hierárquica foram realizadas para os dois experimentos.

2.4 REFERÊNCIAS

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.

CLIFFORD, M. N., SCALBERT, A. Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80, 1118–1125, 2000.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic, 1982. p. 181-207.

HATCHER, L.; STEPANSKI, E. **A step-by-step approach to using the SAS system for univariate and multivariate statistics**. Cary, NC: SAS Institute Inc, 1994.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. (Eds.) **Natural Food Colorants**. 2nd ed. Londres: Chapman & Hall, 1996. p. 245- 309.

JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A. A review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **Journal of Food Chemistry** 11: 279-308, 1987.

MACHEIX J-J, FLEURIET A., BILLOT J. **Fruit Phenolics**. Boca Raton, USA: CRC Press, 1990.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. da. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do CEPPA**, 24 (1): 59-82, 2006.

MCGUIRE, R.G. Reporting of objective color measurements. **HortScience** 27, 1254–1255, 1992.

NUNES, M.C.N.; BRECHT, J.K.; MORAIS, A.M.M.B.; SARGENT, S.A. Physical and chemical quality characteristics of strawberries after storage are reduced by a short delay to cooking. **Postharvest Biology and Technology**, 6: 17-28, 1995.

PINTO, M. S.; LAJOLO, F. M. ; GENOVESE, M. I. . Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Chemistry**, 107: 1629-1635, 2008.

REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grape. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 46: 4592-4597, 1998.

RUFINO, M. S. M. ; ALVES, R. E. ; BRITO, E. S. ; MORAIS, S. M. ; SAMPAIO, C. G ; Jimezes-Perez, J. ; Saura-Calixto, F.D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006 (Comunicado Técnico).

RUFINO, M. S. M. ; ALVES, R. E. ; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M. ; SAMPAIO, C. G. ; Jimezes-Perez, J. ; Saura-Calixto, F.D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007 (Comunicado Técnico).

SHIN Y., LIU R.H., NOCKC, J.F.; HOLLIDAY D., WATKINS, C.B. (2007) Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, 45, 349–357.

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

TERADA, M.; WATANABE, Y.; KUNITOMA, M.; HAYASHI, E. Differential rapid analysis ascorbic acid and ascorbic acid 2-sulfate by dinitrophenylhydrazine method. **Annals of Biochemistry**, 4: 604-8, 1979.

WROLSTAD, R. E. **Colors and pigment analysis in fruit products**. Corvallis: Oregon Agricultural Experimental Station, 1976. 17 p.

PARTE 2
RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE 2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa parte do trabalho são apresentados dois capítulos compostos por artigos independentes, elaborados a partir dos resultados da pesquisa, estruturados de tal forma que atinjam, em seu conjunto, os objetivos expostos no capítulo 2 da Parte 1.

O capítulo 1, com título “*Ellagic acid, antioxidant activity and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars grown in the Brazilian savannah*” aborda os resultados dos experimentos 1 e 2 e foi submetido para publicação na revista *Food Science and Technology*. O artigo tem como objetivo investigar os efeitos dos estágios de maturação e da temperatura de armazenamento em algumas características físicas, químicas, nutricionais, e na atividade antioxidante *in vitro* de morangos ‘Osogrande’ e ‘Camino Real’ produzidos na região do cerrado brasileiro.

O segundo capítulo, intitulado “*Color and antioxidant properties of ‘Camino Real’ strawberry frozen pulp and jam during storage*”, enviado para publicação na revista *Food Science and Technology International*. O objetivo neste artigo é avaliar os efeitos do processamento e do tempo de armazenamento na qualidade da cor e nos teores de antioxidantes de polpas congeladas e geleias feitas com morangos cv. ‘Camino Real’.

Optou-se pela reprodução, em cada capítulo, dos textos a serem publicados de acordo com as normas exigidas pela revista. Exemplos de cromatogramas e de espectros das análises em HPLC de ambos os artigos são apresentados no **APÊNDICE 1**.

Ao final da parte 2, a conclusão geral da pesquisa é apresentada.

Capítulo 1. Ellagic acid, antioxidant activity and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars grown in the Brazilian savannah

Lívia de Lacerda de Oliveira Pineli^{1†}, Celso Luiz Moretti², Marcos Sodré dos Santos³; Alinne Bezerra Campos³, Andreia Viana Brasileiro³; Andressa Carrijo Córdova³; Marileusa Dosolina Chiarello³

¹College of Health Sciences, University of Brasilia, 70910-900, Brasilia, DF, Brazil; ²Embrapa Vegetables, Rod. BR 060, km 09, C.P. 218, 70359-970, Brasília, DF, Brazil; ³Catholic University of Brasilia, 1966700, Brasilia, DF.

*corresponding author

Abstract

The present work evaluated quality and antioxidant characteristics of 'Osogrande' and 'Camino Real' strawberries grown in the Brazilian savannah. Strawberries were harvested, selected, graded, and stored at 5 and 15°C. Berries were evaluated for antioxidant variables, physical and chemical characteristics at different harvest maturity. It was observed that vitamin C increased from green to pink stage and reduced from pink to full ripe fruits for both genotypes. Anthocyanins increased 9 to 13-fold from green to pink stage for 'Osogrande' and 'Camino Real', respectively. Total ellagic acid changed with ripening stages, but the behavior was not the same for both genotypes. In Principal Components Analysis (PCA), variables related to antioxidants and decay, and 'Osogrande' fruit stored at 15°C, were positively associated to PC1.

† Phone: + 55 61 3356 9334 Fax +55 613356 9510 E mail: pineli@ucb.br

PC2 was positively associated to total soluble solids and color variables, and negatively correlated to anthocyanins and 'Camino Real' fruits following two days of storage.

Keywords: strawberries; refrigerated storage; ripening; quality; phenolics; Principal Components Analysis – PCA; color.

1. Introduction

Oxidative stress is a major issue in human health. It is usually associated with an increase in the generation of free radicals and the inability of biological systems to tackle this disequilibrium. Uncontrolled increases in oxidant concentrations can cause reactions in chain, mediated by free radicals, attacking, indiscriminately, proteins, lipids and DNA, affecting normal biological functions (Vatten & Shetty, 2005). Many pathological conditions and illnesses are associated with either high levels of free radicals or with the reduction in free radical scavenging capacity. In some cases, both conditions can contribute to a specific pathological condition (Mateos, Lecumberri, Ramos, Goya e Bravo, 2005). Therefore, one can assume that the balance among oxidant and antioxidant substances can be considered the threshold between health and chronicle diseases, besides other pathological conditions, such as neurological illnesses, inflammations, atherosclerosis, carcinogenesis, and diabetes, among others (Nöthlings et al., 2008).

Antioxidants from fruits and vegetables are considered an important protection factor against oxidative stress and its deleterious consequences to human health. Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.), a very popular berry with high visual appeal and desirable flavor, is also considered a good source of

antioxidants, mainly given to its high vitamin C and phenolic contents. Phenolic classes commonly found in strawberries are hydroxybenzoic acids (gallic and ellagic acids), hydroxycinnamic acids (p-cumaric), hydrolysable tannins (ellagitannins), flavonols (quercetin, kaempferol and myricetin), flavan-3-ols (catequins), and anthocyanins, being pelargonidin-3-glycoside, the most important flavonoid pigment (Seeram, Lee, Scheuller & Heber, 2006). *In vivo* (Mateos et al., 2005) and *in vitro* (Pinto, Kwon, Apostolidis, Lajolo, Genovese & Shetty, 2008a) studies have been recently carried out to establish the effects of strawberries on free radical scavenging and on the prevention of cardiovascular diseases. However, it is important to consider that the protective effect of antioxidants can be dose-dependent and that antioxidant contents in strawberries can vary by many factors, such as genotype and growing conditions, given that phenolic compounds are products of the secondary metabolism (Dixon & Paiva, 1995).

Genotype and environmental conditions can influence physical and chemical characteristics of strawberries (Pinto, Lajolo & Genovese, 2008b; Hernanz, Recamales, Melendez-Martínez, Gonzales-Miret & Heredia, 2007; Ayala-Zavalla, Wang, Wang & Gonzalez-Aguilar, 2004; Cordenunsi, Nascimento, Genovese & Lajolo, 2002). A complex interaction between temperature and day duration determines yields and quality of strawberry cultivars in a given region (Scott & Laurence, 1975). Therefore, when a cultivar is selected for a certain environmental condition, but it is grown in another one, changes in yield and fruit quality are expected. In Brazil, strawberries are grown in tropical, subtropical and temperate climates. Over the last years, the production expanded to places varying from mild to hot tropical wet-dry climates, such as

the one observed in the central region of the country, also known as the Brazilian savannah. This region has an average temperature of 20.5°C and most of the rain is concentrated from November through April, whereas other months are characterized by a very dry season. In the rainy season, strawberries are frequently harvested at $\frac{3}{4}$ ripe (pink) or even $\frac{1}{2}$ ripe (green) stage, in order to prevent postharvest losses due to softening and fungal decay. As fruits are non-climateric, full ripeness is not reached and they are consumed without the best sensory characteristics. Every other year new genotypes, mainly from California and Florida breeding programs, are introduced in the Brazilian savannah. The evaluation of how soil and water management as well as climatic conditions affect the quality and antioxidant properties of these new genotypes is desirable.

The objective of this work was to investigate the effects of harvest maturity and storage temperature on some physical, chemical and nutritional characteristics and in vitro antioxidant capacity of 'Osogrande' and 'Camino Real' strawberries grown in the Brazilian savannah. Moreover, this study considered differences in fruit quality and antioxidant variables among strawberry cultivars and storage conditions by means of multivariate analysis.

2. Materials and methods

2.1. Fruit harvest, treatment and storage conditions

Strawberry fruits, cultivars Osogrande and Camino Real, grown in the Federal District (15°41'S, 48°10'W, 1200m altitude) were harvested on the same commercial field, located in Brazlândia. Fruits were graded for size and external color, sorted to eliminate damaged material and transported, under

refrigeration, to the postharvest laboratory of Embrapa Vegetables (30km). The same day, they were classified according to harvest maturity (1/2 ripe or green, 3/4 ripe or pink and full ripe) and packed into vented crystal clamshell (PET) boxes. Samples of all ripening stages were immediately frozen at -80°C until analysis. Samples of 3/4 ripe (pink, commercial ripeness) strawberries of both cultivars were stored at 5 or 15°C for 8 days (85-90% relative humidity). Sensory, physical and chemical analyses were performed every 2 days for weight loss, overall quality, decay assessments, color and firmness. Frozen samples were then quickly transported to the Food Science and Technology Laboratory, Catholic University of Brasilia, where they were stored at -80°C and analysed for moisture content, soluble solids content, total titratable acidity, total vitamin C content, total phenolic compounds, total antioxidant capacity assays, total anthocyanins, flavonoids and total ellagic acid contents.

2.2. Weight loss, overall quality, and decay assessments

Weight loss, overall quality and decay assessments were performed according to the method described by Shin, Nockc, Holliday & Watkins (2007). Overall quality was determined by means of a 1–5 scale according to the percentage of surface area damaged, where 1=unacceptable (>50% surface showing skin damage or discoloration), 2=bad (20–50% surface affected), 3=acceptable (5–20% surface affected), 4=good (up to 5% surface affected), and 5=excellent. Results were expressed as an overall quality index. Fruit with visible mold growth were expressed as percentage of fruit showing decay symptoms. Only the fruits free of excessive damage were used for the other analyses.

2.3. Color and firmness

Color was measured using a Minolta (CR-400b) Chromameter (Japan). Measurements were expressed as L* value (dark to light), chroma (C, intensity of color) and hue angle (h° , actual color, or redness), calculated with the equations:

$$C=(a^2+b^2)^{1/2} \text{ (Eq.1)}$$

$$h^\circ=\tan^{-1} (b/a) \text{ (Eq. 2)}$$

Two readings were taken around the equatorial region of each of three fruits for each replicate and the average of the values for each treatment was calculated. Firmness was measured by a 10mm depth puncture test on each fruit with intact skin using a penetrometer (SAMMAR Ltda[®], Brazil) fitted with a 8.0mm diameter flathead probe. Results were expressed in Newtons.

2.4. Total soluble solids (TSS) and total titratable acidity (TTA)

Strawberries (n=5) were homogenized (calyx removed) (Ultraturrax TE102E, Tecnal, Brazil) and centrifuged at 15°C (Quimis Q222RM, Brazil). An aliquot was used to determine TSS with a refractometer (Quimis Q767, Brazil). Result was expressed as °Brix. TTA was determined by titration after diluting each 5mL aliquot of strawberry juice to 50mL with distilled water. Titration was carried out to pH 8.2 using a 0.1mol.L⁻¹ NaOH solution. Results were expressed as meq. citric acid.kg⁻¹ of fresh weight (FW).

2.5. Determination of total Vitamin C

Total vitamin C content was quantified in accordance with the dinitrophenylhydrazine (DNPH) method, modified by Nunes, Brecht, Morais &

Sargent (1995). One gram of frozen fruit tissue was homogenized with 19mL of a mixture of 6% metaphosphoric acid in 2mol.L⁻¹ acetic acid. The mixture was centrifuged at 17,600×g for 15min at 4°C. The supernatant was filtered through Whatman #1 filter paper. An aliquot of 0.05mL of 0.2% 2,6-dichlorophenolindolphenol (DCPIP) was added to 1mL of the supernatant and incubated at room temperature for 1 h. Thiourea solution (2%) in 5% metaphosphoric acid and 0.5mL of 2% DNPH in 4.5mol L⁻¹ sulfuric acid were added and the solution was incubated at 60°C for 3h. Tubes were placed in an ice bath and 2.5mL of ice cold 90% sulfuric acid were slowly added. Tubes were vortexed and total vitamin C was measured by absorbance at 540nm using a standard curve. Concentrations of vitamin C were expressed as mg ascorbic acid.kg⁻¹FW.

2.6. Extraction and measurement of phenolic compounds and total antioxidant capacity assays

2.6.1 Sample extraction

Frozen strawberries pieces were crushed and 10g of fruit were homogenized with 100mL of 80% acetone using a homogenizer (Turratec TE102E, Tecnal, Brazil), as described by Shin et al. (2007). The homogenate was filtered through Whatman #1 paper and acetone was evaporated using a rotary evaporator at 45°C for 30min. Deionized water was added to each sample in order to bring them to the final volume of 10mL. The extracts were kept frozen at -80°C until analysis and were used for the measurement of phenolic compounds and total antioxidant activity assays. All extractions were done in duplicate, and the subsequent assays were run in triplicate.

2.6.2. Phenolic compounds content

Total phenolic compounds were quantified using a modified Folin-Ciocalteu colorimetric method (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, 1999). A 0.2mL aliquot of the 40-fold diluted strawberry extract was added to a 15mL tube and 0.2mL of 1:10 Folin-Ciocalteu reagent:water solution was added to the mixture. The tube was allowed to stand at room temperature for 1min. Then, 2mL of 7.5% Na₂CO₃ was added to the mixture. Absorbance was measured at 765nm versus a blank after 2h at room temperature. The results were expressed as mg gallic acid equivalent.kg⁻¹FW.

2.6.3 Total antioxidant capacity

2.6.3.1 DPPH radical-scavenging activity

The antioxidant capacity was determined by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging method according to Rufino et al. (2007)). Aliquots of 0.1mL of the previously diluted (100, 50 and 25mg.mL⁻¹) strawberry extracts were mixed to 3.9mL of 0,06mM DPPH. The solutions were incubated at 25°C for 25min. Absorbance was then determined at 517nm using methanol as a blank and methanolic solutions of BHT at five concentrations (25 to 200mg.mL⁻¹) in the place of strawberry extracts as control. Total antioxidant activity was expressed as μmol BHT equivalent.g⁻¹ fruit (FW).

2.6.3.2. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

The antioxidant activity by FRAP assay was determined according to the method described by Rufino et al. (2006). In the darkness, a 90μL aliquot of each extract dilution (40, 20 and 10mg.mL⁻¹) was mixed with 270μL of distilled

water and 2.7mL of FRAP reagent. Tubes were vortexed and incubated at 37°C for 30min. Absorbance was determined at 595nm using FRAP reagent as blank and 500 to 2000µM ferrous sulphate solutions substituting strawberry extracts as a control. Results were expressed as µM ferrous sulphate.g⁻¹fruit (FW).

2.7. Determination of total anthocyanins

Anthocyanins were determined according to Shin et al. (2007) with some modifications. One gram of frozen strawberry was added to 10mL of methanol containing HCl (0.5%, v/v), homogenized for 3min and held at 4°C for 1h in the darkness. The slurry was centrifuged at 17,600×g for 15min at 4°C. The absorbance of the supernatant was measured at 515nm. Total anthocyanins content was calculated using the extinction coefficient (ε) equal to 3.6 x 10⁶ mol⁻¹ m⁻¹. Total anthocyanin content was expressed as mg pelargonidin-3-glucoside equivalent.kg⁻¹FW.

2.8. Extraction of total ellagic acid

Extraction and hydrolysis of ellagitannins methods were modified from Pinto et al. (2008b). Samples of lyophilized strawberry powder (0.5g) were extracted three times in 80% methanol (50mL the first time, 25mL the next two times) at moderate speed for 1min (Ultraturrax homogenizer Turratec TE 102E, Brazil), while cooled down in ice and vacuum filtered through Whatman #1 filter paper. An aliquot of 2mL of the combined extracts was dried with gaseous nitrogen and 2mL of 2N TFA were added. Hydrolysis was performed in a glycerin bath at 120°C for 60min. Hydrolysed extracts were rotaevaporated at 95°C for 2min,

ressuspended at 1mL of HPLC grade methanol, filtered in 0.22 μ m PTFE filters, and analyzed by HPLC. Results were expressed as mg ellagic acid . kg⁻¹FW.

2.9. HPLC quantification of total ellagic acid content

Identification and quantification of flavonoids and ellagic acid were achieved using analytical reversed-phase HPLC in a Varian Pro Star system with autosampler and ternary pump and UV-Vis detector. Some extracts were also analyzed in a HPLC coupled with DAD detector (Shimadzu, SPD-M10A DAD, Germany), in order to confirm the structures previously identified by time retention with the UV - Vis detector. The column used was 250mm x 4.6mm, i.d., 5 μ m, Prodigy ODS3 reversed-phase silica (Phenomenex Ltd., USA) and elution solvents were A, water:tetrahydrofuran:trifluoroacetic acid (98:2:0.1) and B, acetonitrile. Solvent gradient was: 17%B for 2min increasing to 25%B after 5min, to 35%B after a further 8min and to 50%B after 5min. Samples were injected in duplicate. External standard was ellagic acid (Sigma Chemical Co. USA). Results were expressed as mg.kg⁻¹FW.

2.10. Statistical Analysis

Experiment for ripening stages effects was carried out using a completely randomized design, with 6 treatments arranged in a 2x3 factorial scheme (two cultivars, three ripening stages) and three replicates. Experiment for storage temperature evaluation was carried on a completely randomized design, with 20 treatments arranged in a 2x2x5 factorial scheme (two cultivars, two temperatures and five sampling times) and three replicates. In both cases, the experimental unit was a box with 300 \pm 10g of strawberries and all analysis were

run in triplicate. Data were submitted to analysis of variance and the averages were compared by the Least Significant Test ($P \leq 0,05$). For the second experiment, Principal Component Analysis and Cluster Analysis were performed in XLSTAT software (Addinsoft, France).

3. Results and discussion

3.1. Effects of ripening stage on fruit quality and antioxidants properties

Strawberry flavor is partially conditioned by the balance between sugars and acids expressed in ripe fruits. The acidity of a typical ripe strawberry is close to 160, ranging from 89.1 to 353.1 meq.citric acid.kg⁻¹FW (Cordenunsi et al., 2002). Total titratable acidity found in the present study was in accordance with the literature (Table 1). 'Osogrande' strawberries were less acid at pink stage. However, titratable acidity in 'Camino Real' fruits was lower for fully ripened berries. Values found for pH tended to be lower for 'Camino Real', except in full ripe stage.

Table 1 Chemical characterization of 'Osogrande' and 'Camino Real' strawberries at different ripening stages

<i>Treatment</i>	<i>Total Titratable Acidity (mg.kg⁻¹FW)^{a,c}</i>	<i>Total Soluble Solids (°Brix)</i>	<i>pH</i>
Green Osogrande	130,47±5,33 ^{bc}	6,0±0,0 ^b	3,17±0,08 ^b
Pink Osogrande	116,47±10,73 ^{ab}	7,5±0,5 ^c	3,29±0,07 ^c
Ripe Osogrande	130,17±13,39 ^b	7,9±0,2 ^c	3,27±0,05 ^{bc}
Green Camino Real	140,61±11,18 ^c	5,03±0,06 ^a	3,06±0,04 ^a
Pink Camino Real	135,98±7,05 ^c	7,07±0,06 ^c	3,19±0,05 ^{bc}
Ripe Camino Real	111,64±2,72 ^a	6,33±0,58 ^b	3,37±0,08 ^b

^a citric acid equivalent; values are expressed as means ± SD (SD for $n = 9$ of three extraction replicates). Means in the same column with common letters are not significantly different ($p < 0.05$)

There were no significant differences for total soluble solids content at pink stage for both cultivars. However, at full ripeness, TSS content for 'Osogrande' was significantly higher than 'Camino Real' (Table 1). Sugar/acid ratio was calculated and 'Osogrande' showed values ranging from 7.7 and 10.1, from green to ripe stage, whereas values for 'Camino Real' ranged from 5.6 to 8.7 (data not shown). Cordenunsi et al. (2002) observed 9.2 as the sugar/acid ratio for 'Osogrande' fruits. Olsson et al. (2004) found a variation in sugar/acid ratio

from 8.9 to 9.9 and from 6.7 to 8.0 for Honeoye and Senga Sengana cultivars, respectively.

The highest value for total Vitamin C content was determined for 'Camino Real' strawberries at pink stage (Table 2). This vitamin increased 2 and 1.6-fold from green to pink stage in 'Osogrande' and 'Camino Real' cultivars, respectively. However, contents of this antioxidant decreased between 14 and 49% from pink to ripe stage.

Table 2 Antioxidants variables of 'Osogrande' and 'Camino Real' strawberries at different ripening stages

Treatment	Vitamin C ^a (mg.kg ⁻¹ FW)	Total Phenolics (mg.kg ⁻¹ FW) ^b	Anthocyanins (mg.kg ⁻¹ FW) ^c	Total ellagic acid (mg.kg ⁻¹ FW)	TAA ^d - DPPH ^e (μ mol. g ⁻¹ FW)	TAA-FRAP ^f (μ mol. g ⁻¹ FW)
Green Osogrande	231,61±23,25 ^a	2169,44±163,98 ^a	23,50±3,54 ^a	216,05±17,29 ^b	11,91±1,42 ^a	34,23±6,81 ^a
Pink Osogrande	468,84±17,54 ^c	2909,48±155,96 ^b	215,46±5,58 ^b	454,16±31,33 ^d	12,21±0,75 ^a	34,30±3,00 ^{ab}
Ripe Osogrande	314,52±24,30 ^b	2234,62±69,61 ^a	226,38±6,56 ^{bc}	194,03±21,27 ^b	12,83±1,08 ^a	30,55±2,42 ^{ab}
Green Camino Real	322,84±38,44 ^b	1786,41±96,06 ^c	17,65±0,42 ^a	308,55±26,02 ^c	9,75±0,83 ^b	26,50±2,01 ^c
Pink Camino Real	528,55±10,28 ^d	1853,25±117,79 ^c	227,96±28,63 ^c	307,33±33,12 ^c	12,01±0,98 ^a	28,49±2,48 ^{bc}
Ripe Camino Real	465,78±38,45 ^c	1743,47±226,05 ^c	292,90±32,27 ^d	166,88±20,98 ^a	10,10±0,43 ^b	24,13±2,97 ^c

^aascorbic acid equivalent; ^bgallic acid equivalent; ^cpelargonidin-3-glycoside equivalent; ^dtotal antioxidant activity; ^eBHT equivalent; ^fferrous sulphate equivalent; values are expressed as means ± SD (SD for n =9 of three extraction replicates) Means in the same column with common letters are not significantly different ($p < 0.05$).

Kafkas Kosar, Paydas, Kafkas & Baser (2006) evaluated quality variables in strawberries at different ripening stages and found out that ascorbic acid content always increased during ripening. The authors also found that such increasing was strongly genotype dependent. The amount of total vitamin C found by Cordenunsi et al. (2002) in strawberries ranged from 401 (cv. Dover) to 853mg.kg⁻¹ FW (cv. Campineiro), showing a wide variation among cultivars. The result reported by these workers for 'Osogrande' was higher than the ones found in the present study. Pinto et al. (2008b) found a content of vitamin C 2.1-fold higher in 'Osogrande' full-ripe strawberries harvested in the winter of 2005 in São Paulo State (Brazil). Differences in the results may be also due to different harvest maturities between the studies. Values found by Skupiён & Oszmiąnski (2004) for strawberries grown in Poland were about 16% to 87% higher than values found in ripe 'Camino Real' in this work. Genotype and environmental conditions as well as differences related to methods of extraction and analysis used in the different published papers must be considered in order to understand and justify the wide range in vitamin C content of strawberries reported above.

'Camino Real' strawberries presented significantly lower content of total phenolic compounds when compared to 'Osogrande' for all ripening stages. Additionally, there were no differences for this variable during ripening of 'Camino Real' fruits. On the other hand, a peak in the concentration of phenolics was observed for 'Osogrande' at the pink stage, and the concentration was higher than the one previously reported by Cordenunsi et al. (2002). However, Cordenunsi, Genovese, Nascimento, Hassimoto, Santos & Lajolo (2005) reported a higher content for 'Osogrande' in another set of experiments. Differences in methodology (HPLC screening and spectrophotometry) as well as environmental conditions could explain the observed variation. The results found in this work are

comparable to those observed by Scalzo, Politi, Pellegrini, Mezzetti, & Battino (2005), for six different cultivars of ripe strawberries, grown in Italy. Nevertheless, Skupi n & Oszmi njski (2004) evaluated other six cultivars in Poland and the results were higher than the observed in the previous studies reported, being 1.82 to 2.55-fold higher than total phenolics determined for ripe ‘Camino Real’ strawberries in the present study.

Anthocyanins contents increased approximately 9 to 13-fold from green to pink stage for ‘Osogrande’ and ‘Camino Real’, respectively. The latter cultivar showed the highest contents at pink and fully ripe stages. The amount of anthocyanins found at ripe stage (Table 2) for both cultivars can be considered low if compared to the results of total anthocyanins in strawberries grown in S o Paulo state (Brazil), reported by Cordenunsi et al. (2002) and Cordenunsi, Nascimento & Lajolo, (2003), respectively. Once again, differences can be associated with environmental conditions as well as other growing practices.

Ellagic acid is considered the most important phenolic compound in strawberries (Hakkinen, Karenlampi, Heinonen, Mykkanen & T orr nen, 1999). There is a particular interest in ellagic acid due to evidences of its potential chemoprotective, anti-inflammatory and antibacterial effects (Vatten & Shetty, 2005). Total ellagic acid changed with ripening stages, but the behavior was not the same for both genotypes. In ‘Osogrande’ strawberries this phenolic increased from green to pink stage and decreased to the lowest value at full ripeness. For ‘Camino Real’ strawberries no differences were found for this phenolic content between green and pink stages. When cultivars were compared, the highest content was observed for ‘Osogrande’ berries at the pink stage and the lowest, for ripe ‘Camino Real’ fruits (Table 2). Olsson et al. (2004) did not find differences in ellagic acid concentrations during ripening of ‘Honeoye’ and ‘Senga Sengana’ strawberries. Pinto et al.

(2008b) reported a significant variation among full ripe strawberry cultivars for total ellagic acid content. The values found for ripe 'Camino Real' are slightly lower than the lowest content reported by Pinto et al. (2008b), for ripe Toyonoka strawberries (Table 2).

The results for total antioxidant activity (TAA) by DPPH and FRAP assays showed no correlation between the methods (results not shown). When TAA was measured using the DPPH method, no significant differences within 'Osogrande' strawberries at different ripening stages were found. On the other hand, 'Camino Real' strawberries had the highest TAA at pink stage, as well as vitamin C content (Table 2). Our results of DPPH agree with those found by Pinto et al. (2008b).

When TAA was assayed using the FRAP method, 'Osogrande' fruits showed significantly higher amounts of antioxidants than 'Camino Real' berries, except for pink stage. Also higher amounts of total phenolics were determined for 'Osogrande' cultivar (Table 2).

Although minor changes occurred in the TAA during ripening, it seems that pink stage tends to present a higher antioxidant activity. Halvorsen et al. (2002) investigated TAA in wild type and commercially grown strawberries using FRAP assay. *Fragaria vesca* showed the highest values for TAA, varying from 66.7 to 70.1 $\mu\text{mol ferrous sulphate.g}^{-1}\text{FW}$, whereas in commercial varieties TAA ranged from 18.5 to 23.4 $\mu\text{mol ferrous sulphate.g}^{-1}\text{FW}$. The results observed in the present study were higher than those reported for commercial varieties but lower when compared to the wild strawberries (Table 2).

3.2. Quality characteristics during refrigerated storage

Fruit stored at 5°C had a better overall quality index (Figure 1a) than fruits stored at 15°C, confirming the well documented, positive effects of lower temperatures for strawberries storage.

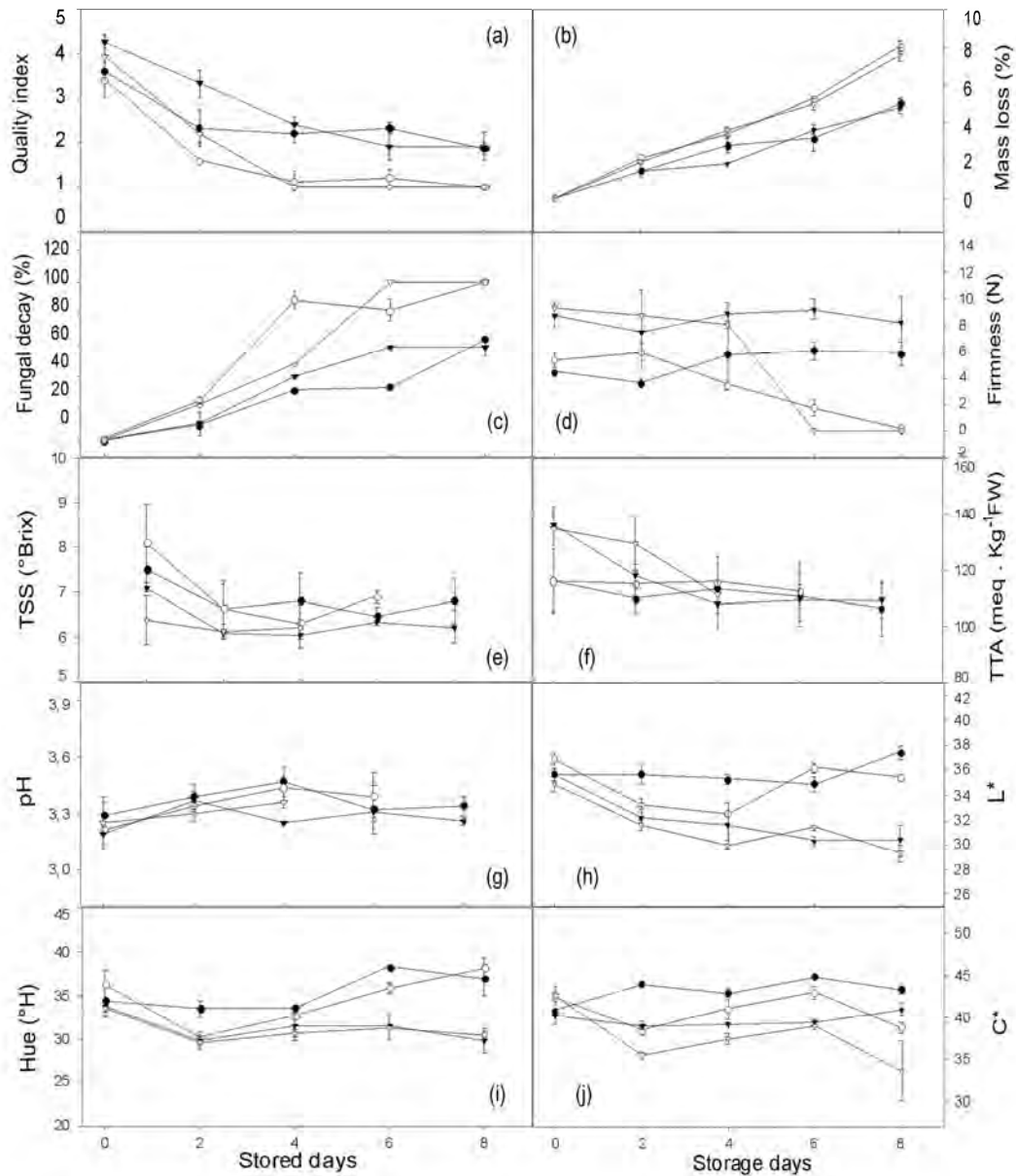


Figure 1 Quality variables in 'Osogrande' and 'Camino Real' strawberries, stored at 5 and 15°C. Variables: (a) quality index, (b) mass loss, (c) fungal decay, (d) firmness, (e) total soluble solids, (f) TTA - total titratable acidity, (g) pH, (h) L* - lightness, (i) °Hue - tonality and (j) C* - saturation. Treatments: 'Osogrande' stored at 5 (■) and 15°C (□), 'Camino Real' stored at 5 (▲) and 15°C (△).

At both temperatures, 'Camino Real' fruits were more acceptable until the fourth day, but decay index was higher than in 'Osogrande' strawberries, between the fourth and the sixth days.

After eight days of storage, mass losses were around 5% and 8% for 5 and 15°C, respectively (Figure 1b). A higher mass loss was observed for both cultivars at 15°C and after the fourth day of storage. 'Osogrande' strawberries lost more mass at 5°C, compared to 'Camino Real' fruits, but no differences were observed at 15°C. Factors as surface area to volume ratio and extent of surface mechanical or microbiological damage may influence the rates of mass loss between different cultivars.

Fungal decay, the major contributor to quality loss (Figure 1c), was higher in 'Camino Real' fruits after 6 days at 5°C than in 'Osogrande' fruit. However, when stored at 15°C, 'Osogrande' had higher decay at the fourth day. All 'Camino Real' strawberries showed signs of decay after the sixth day at 15°C. For fruits stored at 5°C, decay was dramatically noticeable between the second and the fourth storage days, when 32 and 40% of 'Osogrande' and 'Camino Real' fruit surface were affected, respectively. For fruits stored at 15°C, damage was even more pronounced. 'Osogrande' and 'Camino Real' fruit surface were 88 and 48%, respectively, affected by decay symptoms.

Firmness (Figure 1d) of 'Camino Real' strawberries was approximately 2 times higher than 'Osogrande' fruits throughout the experimental period. Two specific events were observed for all treatments: firmness increasing due to drying and firmness decreasing due to decay. 'Camino Real' strawberries were stable at 5°C, but softened at 15°C at the sixth storage day. There was a 20% reduction in firmness for 'Osogrande' strawberries after two days, followed by an increase of 63% until the eighth day at 5°C, whereas for strawberries stored at 15°C, firmness decreased 6.0-fold for the same experimental period.

At 5°C, total soluble solids (Figure 1e) in 'Osogrande' and 'Camino Real' strawberries decreased 9.3% and 11.9%, respectively, during all the storage time. Significant decreases at 15°C were observed only for 'Osogrande' (14.8%).

At the beginning of the storage period, total titratable acidity (Figure 1f) for 'Camino Real' strawberries was higher than 'Osogrande' fruits. However, this difference disappeared after two and four days of storage, at 5 and 15°C, respectively. TAA in 'Camino Real' strawberries were 19.5% and 17.4% lower after eight days at 5 and 15°C, respectively. In 'Osogrande' fruit, TAA decrease was slighter (8.5% at 5°C and 2.9% at 15°C). As the rate of decrease of TAA was higher at 5°C, higher fruit acidity was observed at higher temperature.

There were no significant differences in pH (Figure 1g) for fruits stored at both temperatures. Slight positive and negative variations along storage were verified, but total variation of pH was about only 8%.

'Camino Real' strawberries were found darker at both temperatures and lightness (Figure 1h) decreased with time. L* value in 'Osogrande' strawberries increased after four and six days, at 15°C and 5°C, respectively.

Low values for hue angle (H°) were verified for 'Camino Real' strawberries at both studied temperatures (Figure 1i). For 'Osogrande' fruits hue angle increased after four days, indicating a decrease in redness.

No significant differences in chroma (Figure 1j) were determined for both cultivars.

Strawberry color is influenced by all factors that affect pigment stability. Storage temperature, pH, presence of enzymes, light, and oxygen are the main factors associated with changes in color (Hernanz, Recamales, Meléndez-Martínez, González-Miret & Heredia, 2008; Wicklund Rosenfeld, Martinsen, Sundfor, Lea, Bruun, Blomhoff, and

Haffner, 2005). Hernanz et al. (2008) studied the relationships between color and pigments of five strawberries cultivars and found best correlations of pigment-color coordinates between pelargonidin-3-rutinoside and the external a^* readings followed by pelargonidin-3-glucoside and the internal L^* .

3.3. Antioxidant characteristics during refrigerated storage

'Camino Real' fruits at 15°C were 16% higher in phenolics than at 5°C, after two days. Similarly, after six days of storage, the content of total phenolics in 'Osogrande' strawberries stored at 15°C was 23% higher than the fruits stored at 5°C (Figure 2a). During storage at 5°C, a 60% decrease in total phenolics was verified for 'Osogrande' fruits until the fourth day whereas no significant changes were observed for fruits stored at 15°C. An increase in total phenolics content ranging from 64 to 79% was observed for both cultivars at both temperatures between the fourth and the sixth days. Once increases in phenolics compounds are normally associated with biotic and abiotic stresses, activating secondary metabolism pathways against pathogens attack (Dixon & Paiva, 1995), it is believed that mass loss and decay could explain the observed trends.

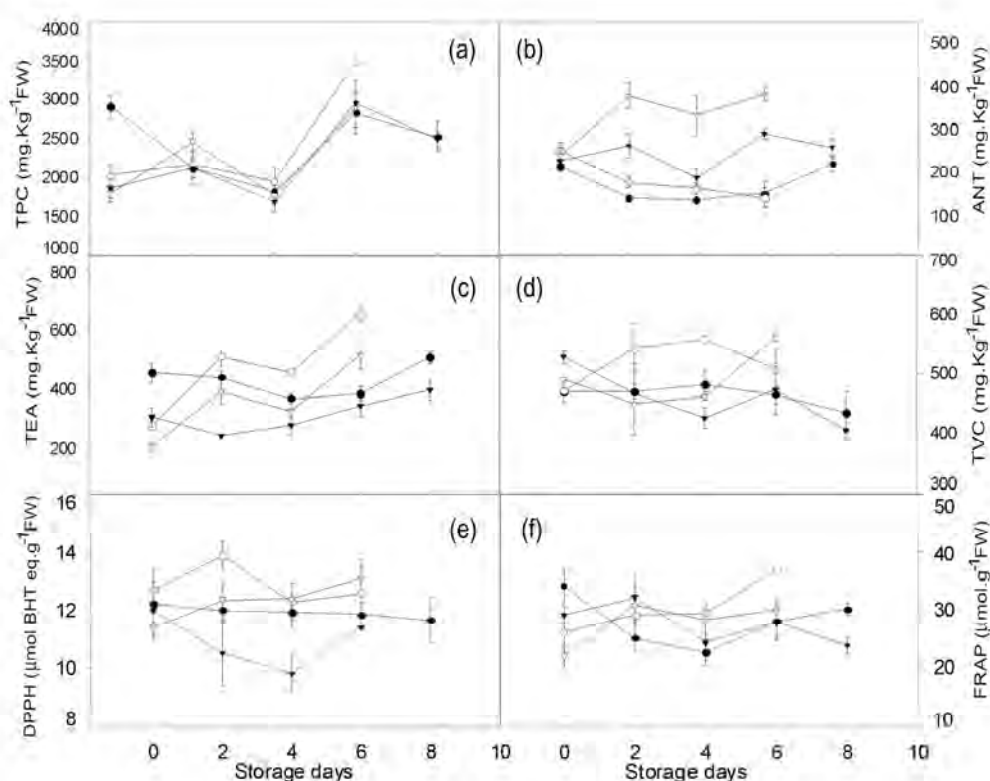


Figure 2 Antioxidant variables in 'Osogrande' and 'Camino Real' strawberries stored at 5 and 15°C. Variables: (a) TPC-total phenolic compounds, gallic acid equivalent; (b) TA-total anthocyanins, pelargonidin-3-glycoside equivalent; (c) TEA-total ellagic acid; (d) TVC-total vitamin C; total antioxidant activity by (e) DPPH, BHT equivalent and (f) FRAP, ferrous sulphate equivalent. Treatments: 'Osogrande' stored at 5(■) and 15°C(□); 'Camino Real' stored at 5(▼) and 15°C(▽).

Higher concentrations of anthocyanins (Figure 2b) were found at 15°C in some storage periods. 'Camino Real' strawberries showed higher contents at 15°C in the sixth day of the experiment. No correlation was observed between total phenolics and anthocyanins contents. According to Holcroft & Kader (1999) anthocyanin synthesis is activated after strawberry harvest and the biosynthetic pathway is not inhibited by storage at low temperatures. This result is in accordance with the findings of Cordenunsi et al (2002) and Hakkinen et al., (1999).

'Osogrande' strawberries had the highest concentrations of total ellagic acid (TEA) (Figure 2c). Berries stored at 15°C had the highest contents of TEA, with the exception of the first day of experiment.

Significant differences were determined for 'Camino Real' after two days (61.6%) and for 'Osogrande' after six days (70.8%). The expressive increasing of TEA during storage was temperature and genotype dependent. If the first and the last day are compared for each treatment, contents increasing ranged from 12%, for 'Osogrande' fruits at 5°C until 145%, for 'Camino Real' strawberries at 15°C. Ayala-Zavala et al. (2004) investigated the effects of storage temperature in phenolic compounds and antioxidant activity and concluded that fruits stored at 5 and 10°C presented higher contents of phenolics and anthocyanins, besides a higher antioxidant activity, when compared to the fruits stored at 0°C.

Similar to phenolic antioxidants at the temperature of 15°C, vitamin content (Figure 2d) increased in all treatments. The tendency for 'Osogrande' cultivar was of stabilization or increasing until four days of storage. 'Camino Real' strawberries exhibited a more oscillatory behavior in vitamin C contents, with a decrease followed by increase at both temperatures. Cordenunsi et al. (2005) studied the effect of storage temperature on chemical composition and antioxidant activity of 'Dover', 'Campineiro' and 'Osogrande' strawberries and verified an increase in vitamin C and anthocyanins with time and temperature. Ellagic acid, flavonoids and total phenolic contents were either not altered or showed slight decreases under all evaluated temperatures.

Total antioxidant activity assayed by DPPH (Figure 2e) was significantly correlated to total vitamin C, total phenolic and total ellagic acid contents ($p < 0.05$, data not shown). Furthermore, higher storage temperatures and the cultivar 'Osogrande' were associated

with higher TAA. No significant changes in TAA assayed by DPPH were observed for 'Osogrande' strawberries stored at 5°C and 'Camino Real' strawberries at 15°C.

Good correlation was established among FRAP (Figure 2f), total phenolic and total ellagic acid content in both cultivars ($p < 0.05$, data not shown). Strawberries at 5°C showed higher antioxidant activity in the beginning of the experiment, but no differences were found for 'Camino Real' along the storage period.

3.4. *Multivariate analysis*

Principal component analysis (PCA) is a multi linear modeling method providing an interpretable overview of the main information in a multidimensional data table. Pearson correlation matrix was used in PCA analysis.

Differences among the studied treatments in relation to storage conditions were emphasized by PCA. Two main principal components (PC) explained approximately 61% of total data variability, called PC1 (34%) and PC2 (27%) (Figure 3). Variables related to antioxidants contents, antioxidant activity and decay were positively associated to PC1, with the exception of total anthocyanins and negatively correlated to quality variables such as quality index, firmness and acidity. Therefore, PC1 differentiates between two groups of strawberry treatments: strawberries with high quality characteristics and strawberries with a high antioxidant profile. Lack of correlation between anthocyanins and antioxidant activity in strawberries has been also found by Meyers et al. (2003) and Cordenunsi et al. (2003). Antioxidant potential of flavonoids is dependent on the number and arrangement of hydroxyl groups across the structure, as well as the presence of electron donating and electron withdrawing substituents in the B-ring structure. A single hydroxy substituent, as

observed in pelargonidin–3-glycoside, the main anthocyanin found in strawberry, generates little antioxidant activity (Bors, Heller, Michel & Saran, 1990).

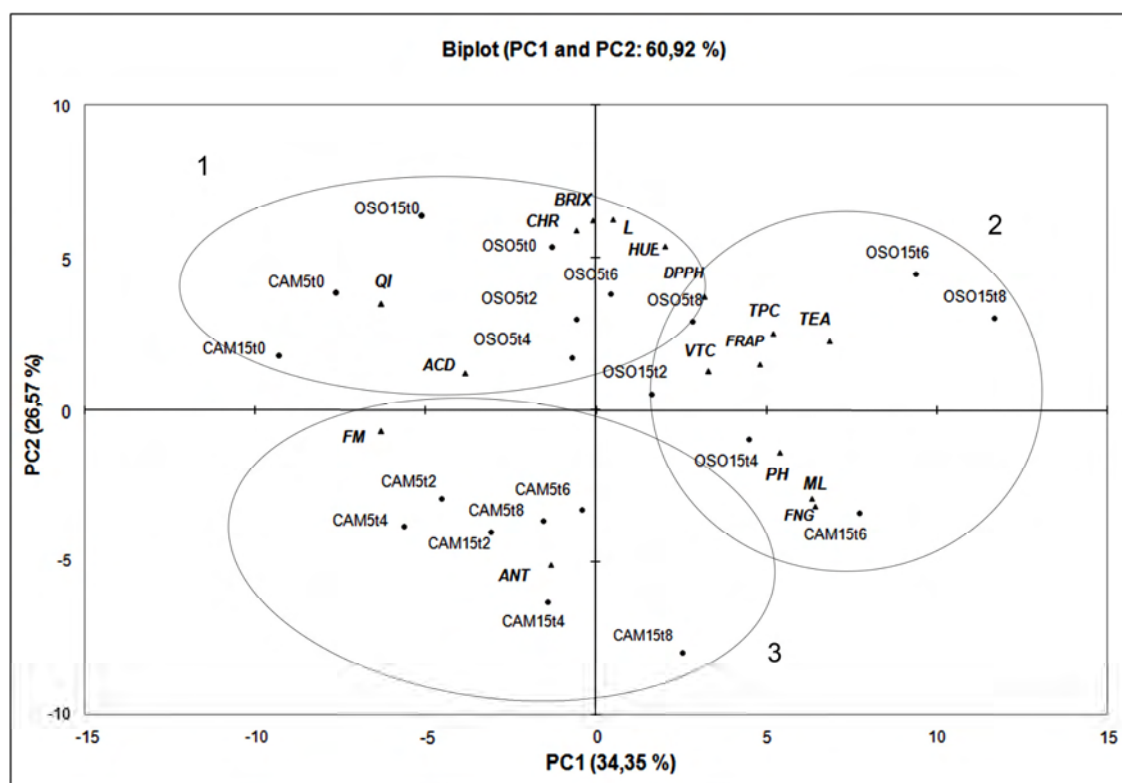


Figure 3 Principal Component Analysis and Clusters (1, 2 and 3) in 'Osogrande' and 'Camino Real' stored at 5 and 15°C. OSO='Osogrande strawberries'; CAM='Camino Real' strawberries; 5, 15=storage temperatures; t0, t2, t4,t6, t8=storage times. Variables are: ANT=anthocyanins; CHR=chroma; DPPH=DPPH assay; ELAG=ellagic acid; FM=firmness; FNG=fungal decay; FRAP=FRAP assay; HUE=H^o; L=L*; ML=mass loss; PH=pH; QI=quality index; TPC=total phenolic compounds; TSS=total soluble solids; TTA=total titratable acidity; VTC=vitamin C.

PC2 was associated to total soluble solids and color variables (anthocyanins, L*, °hue and chroma). This component identified samples with low luminosity, high redness, low chroma, high anthocyanins and low total soluble solids. It is interesting to note that consumers usually associated redness and sweetness in strawberries. But 'Camino Real' strawberries had deeper red color and lower total soluble solids content.

When cluster analysis was applied, three clusters were formed (Figure 4). The first cluster was represented by initial samples of both cultivars and storage temperatures, and treatments including 'Osogrande' strawberries after two days of storage at 5°C. This cluster had, on average, the highest quality index, total soluble solids, total titratable acidity, L*, H° and C*, and the lowest mass loss, fungal decay, pH, anthocyanins and FRAP-TAA values. In the second group, comprised of 'Osogrande' strawberries following two days at 15°C and 'Camino Real' stored at 15°C for six days, the highest values of all the antioxidants variables, but the worst sensory quality characteristics values were remarkable. The third and last group, comprised of the remaining 'Camino Real' treatments, predominantly following two days of storage at 5°C, showed as main characteristics the highest anthocyanins concentrations, redness and firmness (probably due to surface drying) and the lowest vitamin C and TPC concentrations, DPPH-TAA, TSS, TTA, lightness, and chroma.

4. Conclusions

'Osogrande' and 'Camino Real' strawberries, grown in the Brazilian savannah, can be considered good antioxidant sources if dietary intake recommendations of vitamin C and guidelines for dietary intake of phenolic compounds are taken into account. Some variations in relation to the values found in the literature were verified, mainly related to anthocyanins, vitamin C and ellagic acid contents found in 'Osogrande' berries. No published data about postharvest behavior, and physical, chemical and antioxidant characterization of 'Camino Real' strawberries was found to compare to our study. 'Camino Real' showed the highest content of vitamin C at the pink stage. Vitamin C tended to increase from green to pink stage and reduce from pink to red stage.

Anthocyanins contents increased approximately 9 to 13-fold from green to pink stage for 'Osogrande' and 'Camino Real', respectively, the latter cultivar showing the highest contents at pink and ripe stages. Total ellagic acid changed according to ripening stages, but the behavior was not the same for both genotypes. In 'Osogrande' strawberries this phenolic increased from green to pink stage and decreased to the lowest value at full ripeness. No differences were found for this phenolic content between green and pink 'Camino Real' strawberries. The results for total antioxidant activity (TAA) by DPPH and FRAP assays showed no correlation between the methods. Minor changes occurred in TAA during ripening. In spite of the fact that ripe berries are, in general, more edible, higher antioxidant contents and activities were observed at pink stage. At this stage higher amounts of total phenolics, total ellagic acid and total vitamin C were verified for both cultivars.

It was verified that 'Camino Real' strawberries had the best initial characteristics of all quality variables. Higher antioxidant profile tended to be higher for 'Osogrande' cultivar and storage at 15°C. However, it is possible that antioxidant increase was related to mass loss and fungal decay, which is not desirable. In fact, according to PCA, quality and antioxidant variables were antagonistic in the present work. Although redness and sweetness are frequently associated by strawberry consumers, it was possible to verify by PCA that this is not a trend for 'Camino Real' strawberries, which showed a higher redness and a lower total soluble solids content during storage and when compared to 'Osogrande' fruits.

Since strawberries grown in the Brazilian savannah are highly perishable, processing or postharvest technology must be applied to reduce postharvest losses, especially in rainy

seasons, and to associate nutritional quality, food safety and acceptability to the strawberry cultivars grown in this region.

Acknowledgments

The authors thank the strawberry grower José Ricardo Aléscio, for supplying the fruits used in the study, and PPPG/UCB, National Council of Science and Technology (CNPq), Embrapa Vegetables and the Ministry of Science and Technology (MCT), for the financial support.

5. References

- Ayala-Zavala, J.F.; Wang, S.Y.; Wang, C.Y.; Gonzalez-Aguilar, G.A. (2004). Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit (2004). *Food Science and Technology*, 37, 687–695.
- Bors, W.; Heller, W.; Michel, S.; Saran, M. (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186, 343-355.
- Cordenunsi, B.R.; Nascimento, J.R.O.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. (2002) Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2581-2586.
- Cordenunsi, B.R.; Nascimento, J.R.O.; Lajolo, F.M. (2003). Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage. *Food Chemistry*, 83, 167-173.
- Cordenunsi, B.R.; Genovese, M.I.; Nascimento, J.R.O.; Hassimoto, N.M.A.; Santos, R.J.; Lajolo, F.M. (2005). Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chemistry*, 93 (1), 113-121.

- Dixon, R.A.; Paiva, N.L. (1995). Stress-Induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7, 1085-1097.
- Häkkinen, S.H., Karenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkanen, H.M., Törrönen, A.R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2274-2279.
- Halvorsen, B.L.; Holte, K.; Myhrstad, M.C.W.; Barikmo, I.; Hvattum, E.; Remberg, S.F.; Wold, A.; Haffner, K.; Baugerod, H.; Andersen, L.N.; Moskaug, J.O.; Jacobs, D.R.; Blomhoff, R. (2002). A Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants. *Journal of Nutrition*, 132, 461–471.
- Hernanz, D.; Recamales, A.F.; Melendez-Martínez, A.J.; Gonzales-Miret, M.L.; Heredia, F.J. (2007). Assessment of the Differences in the Phenolic Composition of Five Strawberry Cultivars (*Fragaria ananassa* Duch.) Grown in Two Different Soilless Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 1846-1852.
- Hernanz, D. Recamales, A.F.; Meléndez-Martínez, A.J.; González-Miret, M.L. Heredia, F.J. (2008). Multivariate Statistical Analysis of the Color/Anthocyanin Relationships in Different Soilless-Grown Strawberry Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (8), 2735-2741.
- Holcroft, D.M., Kader, A.A. (1999). Controlled atmosphere-induced changes in pH and organic acid metabolism may affect color of stored strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 17, 19–32.
- Kafkas, E., Kosar, M., Paydas, S., Kafkas, S., Baser, K.H.C. (2006). Quality characteristics of strawberry genotypes at different ripening stages. *Food Chemistry*. 100, 1229–1236.
- Mateos, R.; Lecumberri, H.; Ramos, S.; Goya, L.; Bravo, L. (2005). Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as

a biomarker for oxidative stress Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography B*, 827: 76–82.

Meyers, K.J.; Watkins, C.B.; Pritts, M.P.; Liu, R.H. (2003). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (23), 6887-6892.

Nöthlings U., Schulze M.B., Weikert C., Boeing H., van der Schouw Y.T., Bamia C. et al. (2008). Intake of vegetables, legumes, and fruit, and risk for all cause, cardiovascular, and cancer mortality in a European diabetic population. *Journal of Nutrition*, 138:775-81.

Nunes, M.C.N.; Brecht, J.K.; Morais, A.M.M.B.; Sargent, S.A. (1995) Physical and chemical quality characteristics of strawberries after storage are reduced by a short delay to cooking. *Postharvest Biology and Technology*, 6: 17-28.

Olsson, M.E., Ekvall, J., Gustavsson, K.E., Nilsson, J., Pillai, D., Sjöholm, I., Svensson, U., Akesson, B., Nyman, M.G.L. (2004). Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): effects of cultivar, ripening, and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2490–2498.

Pinto, M.S.; Kwon, Y.; Apostolidis, E.; Lajolo, F.M.; Genovese, M.I.; Shetty, K. (2008a). Functionality of Bioactive Compounds in Brazilian Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) Cultivars: Evaluation of Hyperglycemia and Hypertension Potential Using in Vitro Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (12), 4386-4392

Pinto, M.S.; Lajolo, F.M. ; Genovese, M.I. (2008b). Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 107: 1629-1635.

Rufino, M.S.M. ; Alves, R.E. ; Brito, E.S. ; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Jimenez-Perez, J.; Saura-Calixto, F.D. (2006). Metodologia Científica: Determinação da Atividade

Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006 Available: <www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/cot_125.pdf>

Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Jimenez-Perez, J.; Saura-Calixto, F.D. (2007). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. Available: www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/Cot_127.pdf

Salminen, J-P. ; Lempa, K. (2002). Effects of hydrolysable tannins on a herbivorous insect: fate of individual tannins in insect digestive tract. *Chemoecology*, 12, 203–211.

Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., Battino, M. (2005). Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 21, 207–213.

Scott, D.H.; Lawrence, F.J. (1975). Strawberries. In. Janick, J.; Moore, N.M. Advances in fruit breeding. (pp.71-92), Indiana. Purdue University Press.

Seeram, N.P; Lee, R.; Scheuller, H.S.; Heber, D. (2006). Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatographic analysis of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chemistry*, 97: 1-11.

Shin Y., Liu R.H., Nockc, J.F.; Holliday D., Watkins, C.B. (2007) Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 349–357.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.

Skupien, K.; Oszmianski, J. (2004). Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *European Food Research Technology*, 219, 66–70.

Vattem D.A.; Shetty K. (2005). Biological functionality of ellagic acid: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 29, 234–266.

Wicklund, T.; Rosenfeld, H.J.; Martinsen, B.K.; Sundfor, W.; Lea, P.; Bruun, T.; Blomhoff, R.; Haffner, K. (2005). Antioxidant capacity and color of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. *Food Science and Technology*, 38, 387–391.

Capítulo 2. Color and antioxidant properties of 'Camino Real' strawberry frozen pulp and jam during storage

Livia de Lacerda de Oliveira Pineli^{1iv}, Celso Luiz Moretti²; Giselle Gleicy Jorge de Souza³; Juliana da Silva Quintiliano Rodrigues³; Márcia Alves Santana³; Talita Orrico Rocha⁴; Marileusa Dosolina Chiarello³

¹ College of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70910-900, Brazil; ² Postharvest Laboratory, Embrapa Vegetables, Brasilia, DF, 70359-970, Brazil;

³ Catholic University of Brasilia, Brasilia, DF, 71966-700, Brazil.

⁴ Human Nutrition Department, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70910-900, Brazil.

Abstract

Strawberries are sensory and nutritional interesting fruits and, in some countries, are the major source of important antioxidants for the local population. This work aimed at evaluating color and antioxidant properties of 'Camino Real' strawberries after processing as frozen pulp and jam and storage for 120 days. Fruits were harvested in different harvesting seasons and processed as frozen pulp and jam. Both products were stored for 120 days. Evaluations were performed monthly. Color and antioxidants were evaluated. Differences between raw materials were observed, mainly for vitamin C, total ellagic acid, anthocyanins and antioxidant activities. Strawberries processed as jam were more affected in terms of quality alteration than berries processed as pulp. Color variables, total phenolic compounds and antioxidant activity were less influenced by storage time than

^{iv} Phone: + 55 61 3356 9334 Fax +55 613356 9510 E mail: liviapineli@yahoo.com.br

other characteristics. Despite of all quality alterations observed, processed strawberry products can still be considered a good source of antioxidants in the Brazillian diet.

Keywords : strawberries, jam, pulp, color, phenolic compounds, antioxidant activity, Principal Component Analysis - PCA.

1 Introduction

Strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) are used in many recipes and desserts, and have high contents of vitamin C and health-promoting phenolic compounds. Seasonality and high perishability are a major issue and the main reason for fruit processing.

Strawberry frozen pulp and jam are very popular shelf-stable products. Frozen pulp is the product obtained from the edible part of the fruits, after crushing or mechanical extraction, followed by freezing as a preservation method (Brunini, Durigan & Oliveira, 2002). Pulp are used by the food industry as an ingredient, or directly destined to consumers, being quite prevalent products. The manufacturing of fruit jams is performed by combining fruits and sugar in similar ratios, followed by cooking, to obtain a tasty product of sufficiently high sugar content with satisfactory keeping qualities (Downing, 1996).

Even though the positive effects of fruits on human health are well-known, flavor and color are the most important factors for consumers for the selection of processed fruit derivatives. An attractive and stable color of strawberry products is the indication of high quality. Anthocyanins are the most important pigments in strawberries, being pelargonidin (bright red color) the predominant pigment and cyanidin (dark red color) the one with minor importance (Gossinger et al., 2009). Strawberry is about the only berry that has pelargonidin as the main anthocyanidin.

Anthocyanin pigments are unstable and susceptible to degradation during processing and storage (Kirka, Özcan & Lu, 2007), which can also have marked effects on the other phenolic components of strawberries, affecting their health-promoting properties (Zafrilla, Ferreres & Tomás-Barberán, 2001). Therefore, choosing an adequate strawberry cultivar for processing may improve appearance, flavor and antioxidant properties of frozen pulps and jams.

'Camino Real' is a cultivar developed in California (Shaw & Larson, 2002). It is characterized by large, firm fruits, with dark-red peel and pulp, and good flavor. It has been recently introduced in the Brazilian market with significant production in the savannah areas. Limited information about 'Camino Real' strawberries and derivative products are available. Moreover, the evaluation of bioactive compounds and antioxidant properties of each strawberry product is interesting given that processed products of seasonal and perishable fruits are many times the dominant way of consumption.

This work aimed at investigating the effects of processing and storage time on color and antioxidants properties of 'Camino Real' strawberries frozen pulps and jams.

2 Materials and methods

2.1 Pulp processing

For pulp processing, 'Camino Real' strawberries were harvested on July 2008, in Brazlândia, Federal District, Brazil (15°41'S, 48°10'W, 1200m of altitude). Fruits were sorted, washed, sanitized and leaves were removed. A pulper machine (Macanuda model DM-Ji, Brazil) was used to extract the pulp, which was then packed in 200g capacity polyethylene bags (Selovac, model 200B, Brazil). The product was then frozen at -18°C

and stored for 120 days, what is equivalent to the real shelf-life observed in the Brazilian market. Every 30 days, samples were analysed for color and chemical characteristics.

2.2 Jam processing

For jam processing, 'Camino Real' strawberries were harvested from the same commercial field on September 2008. Fruits (40kg) were sorted, washed and sanitized. After leaves removal, strawberries were manually diced. The pH was analysed and alcohol qualitative test for pectin content was performed to check the need for adding acids or industrial pectin. Jam formulation was 57% fruit, 43% sugar. Fruits and sugar were brought to a steam kettle with 300L capacity (Quartinox QX-3, Brazil). After one hour at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ under slow agitation, juice was extracted in the presence of sugar and the steam was then fed to the equipment to begin the heating and concentration processes. The mixture was boiled to a final concentration of 66°Brix , measured with a refractometer (Instrutherm, RT-280, Brazil). The final pH was 3.2. Jam was hot-packed at $85\text{-}90^{\circ}\text{C}$ in 250mL glass jars, immediately sealed with plastisol lined metal lids, and inverted for 5min to sterilize the lids. Jars were then returned to normal position for air-cooling. Jams were stored for 120 days at 20°C in the darkness. Analysis of color and chemical characteristics were performed every 30 days.

2.3 Color

Pulp and jam colors were quantified with a Minolta (CR-400b) Chromameter (Japan). This method gives numeric values of three chromatic scales (L,a,b), where L is the brightness ranging from no reflection for black ($L = 0$) to perfect diffuse reflection for white ($L = 100$), the value "a" ranges from negative values for green to positive values for red and "b"

ranges from negative values for blue and positive values for yellow. Measurements were expressed, as L^* value (dark to light), chroma (C^* , intensity of color) and hue angle (h° , actual color, or redness), calculated with the equations:

$$C = (a^2+b^2)^{1/2} \text{ (Eq.1)}$$

$$h^\circ = \tan^{-1} (b/a) \text{ (Eq. 2)}$$

Two readings of each experimental unit were taken using a cuvette and the average values for each treatment was calculated.

2.4 Determination of total Vitamin C

Total vitamin C content was quantified in accordance to the dinitrophenylhydrazine (DNPH) method, modified by Nunes, Brecht, Morais & Sargent (1995). One gram of frozen sample was homogenized with 19mL of a mixture of 6% metaphosphoric acid in 2mol.L^{-1} acetic acid. The mixture was centrifuged at $17,600\times g$ for 15min at 4°C . The supernatant was filtered through Whatman #1 filter paper. An aliquot of 0.05mL of 0.2% 2,6-dichlorophenolindolphenol (DCPIP) was added to 1mL of the supernatant and incubated at room temperature for 1 h. Thiourea solution (2%) in 5% metaphosphoric acid and 0.5mL of 2% DNPH in 4.5mol.L^{-1} sulfuric acid were added and the solution was incubated at 60°C for 3h. Tubes were placed in an ice bath and 2.5mL of ice cold 90% sulfuric acid were slowly added. Tubes were vortexed and total vitamin C was measured by absorbance at 540nm using a standard curve. Concentrations of vitamin C were expressed as mg ascorbic acid. kg^{-1}FW .

2.5 Extraction and measurement of phenolic compounds and total antioxidant capacity assays

2.5.1 Sample extraction

Frozen samples were weighed (10g) and homogenized with 100mL of 80% acetone using a homogenizer (Turratec TE102E, Tecnal, Brazil), as described by Shin, Liu, Nockc, Holliday & Watkins, (2007). The homogenate was filtered through Whatman #1 paper and acetone was evaporated using a rotary evaporator at 45°C for 30min. Deionized water was added to each sample in order to bring them to the final volume of 10mL. The extracts were kept frozen at -80°C until analysis and were used for the measurement of phenolic compounds and total antioxidant activity assays. All extractions were done in duplicate, and the subsequent assays were run in triplicate.

2.5.2 Total Phenolic Contents (TPC)

Total phenolic contents (TPC) were quantified using a modified Folin-Ciocalteu colorimetric method (Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventos, 1999). A 0.2mL aliquot of the 40-fold diluted sample extract was added to a 15mL tube and 0.2mL of 1:10 Folin-Ciocalteu reagent:water solution was added to the mixture. The tube was allowed to stand at room temperature for 1min. Then, 2mL of 7.5% Na₂CO₃ was added to the mixture. Absorbance was measured at 765nm versus a blank after 2h at room temperature. The results were expressed as mg gallic acid equivalent.kg⁻¹FW.

2.5.3 Total antioxidant capacity

2.5.3.1 DPPH radical-scavenging activity

Total antioxidant capacity by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl – DPPH-TAA) radical-scavenging method was analysed according to Rufino et al. (2007). Aliquots of 0.1mL of the previously diluted (100, 50 and 25mg.mL⁻¹) sample extracts were mixed to 3.9mL of 0,06mM DPPH. The solutions were incubated at 25°C for 25min. Absorbance was then determined at 517nm using methanol as blank and methanolic solutions of BHT at five concentrations (25 to 200mg.mL⁻¹) in the place of strawberry extracts as control. Total antioxidant activity was expressed as $\mu\text{mol BHT equivalent.g}^{-1}$ fruit (FW).

2.5.3.2 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Total antioxidant activity by FRAP (FRAP-TAA) assay was determined according to the method described by Rufino et al. (2006). In the darkness, a 90 μL aliquot of each extract dilution (40, 20 and 10mg.mL⁻¹) was mixed with 270 μL of distilled water and 2.7mL of FRAP reagent. Tubes were vortexed and incubated at 37°C for 30min. Absorbance was determined at 595nm using FRAP reagent as blank and 500 to 2000 μM ferrous sulphate solutions substituting strawberry extracts as a control. Results were expressed as $\mu\text{M ferrous sulphate.g}^{-1}$ fruit (FW).

2.6 Determination of total anthocyanins

Anthocyanins were determined according to Shin et al. (2007) with some modifications. One gram of frozen sample was added to 10mL of methanol containing HCl (0.5%, v/v), homogenized for 3min and held at 4°C for 1h in the darkness. The slurry was centrifuged at 17,600 $\times g$ for 15min at 4°C. The absorbance of the supernatant was measured at

515nm. Total anthocyanins content was calculated using the extinction coefficient (ϵ) equal to $3.6 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ m}^{-1}$. Total anthocyanin content was expressed as mg pelargonidin-3-glucoside equivalent.kg⁻¹FW.

2.7 Extraction of total ellagic acid (TEA)

Extraction and hydrolysis of ellagitannins methods were modified from Pinto, Lajolo & Genovese (2008). Lyophilized samples powder (0.5g) were extracted three times in 80% acetone (50mL the first time, 25mL the next two times) at moderate speed for 1min (Ultraturrax homogenizer Turratec TE 102E, Brazil), while cooled down in ice and vacuum filtered through Whatman #1 filter paper. An aliquot of 2mL of the combined extracts was dried with gaseous nitrogen and 2mL of 2N TFA were added. Hydrolysis was performed in a glycerin bath at 120°C for 60min. Hydrolysed extracts were rotaevaporated at 95°C for 2min, resuspended at 1mL of HPLC grade methanol, filtered in 0.22µm PTFE filters, and analyzed by HPLC.

2.8 HPLC quantification of total ellagic acid content

Identification and quantification of flavonoids and ellagic acid were achieved using analytical reversed-phase HPLC in a Varian Pro Star system with autosampler and ternary pump and UV-Vis detector. Some extracts were also analyzed in a HPLC coupled with DAD detector (Shimadzu, SPD-M10A DAD, Germany), in order to confirm the structures previously identified by time retention with the UV - Vis detector. The column used was 250mm x 4.6mm, i.d., 5 µm, Prodigy ODS3 reversed-phase silica (Phenomenex Ltd., USA) and elution solvents were A, water:tetrahydrofuran:trifluoroacetic acid (98:2:0.1) and B, acetonitrile. Solvent gradient was: 17%B for 2min increasing to 25%B after 5min, to

35%B after a further 8min and to 50%B after 5min. Samples were injected in duplicate. External standard was ellagic acid (Sigma Chemical Co. USA). Results were expressed as mg ellagic acid . kg⁻¹FW.

2.9 Statistical Analysis

Experiments were carried out in a completely randomized design, with 12 treatments arranged in a 2x6 factorial scheme (two treatments, jam and pulp, and six conditions, raw material, processed – day 0, and stored after 30, 60, 90 and 120 days) and three replicates. The experimental unit was a package of 200±10 grams of frozen pulp or a jar with 250±10 grams of jam. All analysis were run in triplicate.

Data were submitted to analysis of variance and the averages were compared by the Least Significant Difference test ($P \leq 0,05$). Principal Component Analysis (PCA) and Cluster Analysis were performed in XLSTAT software (Addinsoft, France) for 36 observations (3 replicates of each treatment) and 10 variables, using Pearson correlation matrix data, to examine the ability of the variables obtained to differentiate among treatments, and elucidate the effects of processing and storage for both products. Results presented are the average of two experiments.

3 Results and discussion

3.1 Color variables in raw materials

During the end of the dry season (September), when there is a peak in strawberry production, it was observed that almost all fruits were harvested fully ripened, whereas fruits harvested on July were at both pink and ripe stages. Consequently, raw material composition are affected by ripening stage and environmental differences between 2008

July and September. From a practical point of view, strawberries of different ripeness degrees are used for processing (Gossinger et al., 2009) which depends on fruit availability in each season and on fruit perishability during rainy months. Therefore, it was observed some differences in color of raw materials from the first and second harvests, being L^* and hue angle higher in fruits used for pulp processing. However C^* was similar for both fresh strawberries (Table 1).

3.2 Antioxidants in raw materials

No differences were observed in total phenolic compounds (TPC) between the raw materials destined to pulp and jam processing. However, total anthocyanins were higher in fresh strawberries used in jam processing, as well as total ellagic acid (TEA) in fruits processed as pulp (Table 1).

Total anthocyanins content found in strawberries destined to jam processing were 59.6% higher than the one observed in berries used for frozen pulp. García-Viguera, Zafrilla, Romero, Abellan, Artes & Tomas-Barberan (1999) reported anthocyanins contents of 110.80, 195.46 and 130.03mg $\cdot\text{kg}^{-1}\text{FW}$ for 'Osogrande', 'Chandler' and 'Tudla' strawberries used for jam processing, respectively. The contents of TEA observed in the present work were within the range found by Pinto et al. (2008), who evaluated TEA in several cultivars of strawberries.

Vitamin C content was 53% higher in frozen pulp strawberries, when compared to jam raw material, possibly reflecting the effect of environmental factors on fruit composition (Table 1). Vitamin C synthesis can be influenced by pre and post-harvest factors such as light incidence during growing season, nitrogen fertilizers, irrigation, temperature management after harvest and application of modified atmosphere (Lee & Kader, 2000). Furthermore,

variations in ripening patterns can explain differences in vitamin C for strawberries frozen pulp and jam.

Total antioxidant activity measured by DPPH (TAA – DPPH) was 36.9% higher in pulp strawberries than in the jam fruits. Similarly, total antioxidant activity measured by FRAP (TAA – FRAP) assay indicated higher antioxidant activity (29.7%) in frozen pulp than in jam, raw materials (Table 1).

Table 1 Effect of processing on antioxidant variables of 'Camino Real' strawberry jam and frozen pulp

	L*	C*	H ^o	Total phenolic compounds ^a	Total ellagic acid	Total anthocyanins ^b	Total vitamin C ^c	DPPH ^{de}	FRAP ^{df}
<i>Raw material (mg.kg⁻¹ fresh fruit)</i>	27.84±2.95 ^{ab}	35.00±5.57 ^{ab}	26.56±3.61 ^{ab}	2697.52±385.2 ^{aA}	214.86±17.1 ^{bb}	304.11±62.71 ^{aA}	397.62±36.16 ^{ab}	13.79±0.24 ^{bb}	30.28±1.11 ^{bb}
<i>Jam (mg.kg⁻¹ jam)</i>	21.16±0.65 ^b	8.01±0.88 ^b	21.76±1.46 ^b	2358.43±101.5 ^b	314.01±18.57 ^a	257.97±6.25 ^b	363.63±24.98 ^b	14.66±0.38 ^b	30.38±1.75 ^b
<i>Raw material (mg.kg⁻¹ fresh fruit)</i>	30.62±3.43 ^{aA}	37.86±9.20 ^{aA}	31.09±5.01 ^{aA}	2637.67±159.4 ^{aA}	263.97±15.67 ^{aA}	190.61±13.44 ^{ab}	685.47±1.04 ^{aA}	18.87±1.04 ^{aA}	39.30±2.96 ^{aA}
<i>Frozen pulp (mg.kg⁻¹ fresh fruit)</i>	33.08±0.95 ^a	26.17±0.77 ^b	35.02±1.63 ^a	2454.2316±55.4 ^b	298.22±13.47 ^a	202.29±4.72 ^a	724.82±7.03 ^a	19.38±1.08 ^a	38.49±0.96 ^a

^aas gallic acid equivalent; ^b as pelargonidin-3-glycoside equivalent; ^cas ascorbic acid equivalent ^dtotal antioxidant activity, ^eas BHT equivalent; ^fas ferrous sulphate equivalent ; values are expressed as means ± SD (SD for n =9 of three extraction replicates) Means in the same column with common letters are not significantly different ($p < 0.05$). Small letters indicate comparison among processed products and their respective raw materials. Capital letters indicate comparison between the raw materials.

Values of TPC are in accordance with the literature (Cordenunsi, Genovese, Nascimento, Hassimoto, Santos & Lajolo, 2005). However, TAA determined by both methods, especially for strawberry frozen pulp, showed higher values if compared to those found by Pinto et al. (2008) and Harvosen et al. (2002) for DPPH and FRAP assays, respectively. This could be related to differences in phenolic compounds profiles found in the studied fruits. Phenolics exhibit different abilities to donate hydrogen atom and to support the unpaired electron and, as far as these antioxidants are concerned, TAA depends on the proportion of tannins, anthocyanins, flavanols, flavonols, hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in each strawberry treatment evaluated and not only on their final content.

3.3. Processing effects on color

Processing affected strawberries pulp and jam color. L^* increased about 8% in pulps, whereas color in jams was 31% darker (Table 1). No changes in redness were noticed in pulps whereas jams presented a 22% increase in Hue angle, which means a decrease in red tonality (Figure 1b). The reduction in C^* (Table 1) occasioned by processing was more pronounced in jams (4.4-fold) than in pulps (1.15-fold). Ngo, Wrolstad & Zhao (2007) found C^* , and H° color values of jam distinctly lower than those of fresh and other processed products, indicating an increase in darkness, decrease in chroma and H° caused by jam manufacturing. The physical state of the product is one of the main factors that authors usually consider when comparing colors of jams and fruits in the raw state. Jam's properties of light reflectance are not similar to that of berries.

During thermal processing, strawberry flavonoids, as catechin, procyanidins and anthocyanins, form condensed products mediated by furfural, product of vitamin C

degradation. These dimeric complexes contribute to the darkening of strawberry products. Maillard reaction, involving reducing sugars, amino acids and vitamin C during thermal processing, must also be taken into account (Ngo et al., 2007). Enzymatic browning can take place during osmotic dehydration, prior to thermal concentration.

3.4 Processing effects on antioxidants

No significant differences were observed in total phenolic compounds in pulps after processing and the raw material. On the other hand, a 15% reduction in these compounds were observed for fruit jam when compared to the same raw material (Figure 1d). Similarly, no differences were found in anthocyanins for pulps, whereas jam processing resulted in 18% decrease when compared to fresh strawberries (Table 1).

Amakura, Umino, Tsuji, & Tonogai, (2000) found no changes in TPC during jam processing of several berries. On the other hand, Koplotek, Otto & Bohm (2005) discussed that processing can lead to copigmentation and self-association of molecules, reducing the number of hydroxyl groups available to react in Folin–Ciocalteu colorimetric assay. García-Viguera et al. (1999) reported a loss of 75.23% of total anthocyanins during 'Osogrande' strawberries processing. These authors observed that cultivars responded differently to processing, as other studied cultivars showed losses of $\pm 36\%$.

Wojdylo, Oszmianski & Bober (2008) found anthocyanins contents of 187.1 and 657.4mg.kg⁻¹ FW in 'Senga Sengana' and 'Elkat' strawberry jams. Nevertheless, the initial monomeric anthocyanin contents of strawberry jams studied by Kirka et al. (2007) were 6.30 and 11.82 mg.kg⁻¹FW for 'Osmanli' and 'Kara' cultivars, respectively. The content of total anthocyanins found in the present work was 257.97 \pm 6.25mg.kg⁻¹FW.

The evaluation of unit operations such as pressing, mashing, sieving and freezing effects on strawberry products are useful to analyse the results found in the present work for frozen non-pasteurized strawberry pulps. Thermal unit operations can be partially related to thermal concentration applied in strawberry jam processing. Ngo et al. (2007) studied the impact of processing on quality of 'Toten' strawberries and found that freezing resulted in an apparent increase in anthocyanins. There was approximately a 70% loss in anthocyanins, around 20% increase in polymeric color, and 23.5% decrease in TPC during strawberry canning processing, where syrup hot filling occurred at 95°C and appertization was conducted at 100°C for 15 minutes. Authors reported a pronounced color change and substantial losses in anthocyanins. They also mentioned that losses of TPC in strawberry jams occurred during processing and after 9 weeks of storage.

TEA contents (Table 1) were found to be higher after pulp (12.9%) and jam manufacturing (46.1%). Zafrilla et al. (2001) evaluated ellagic acid derivatives contents after red raspberry jams processing and storage. Thermal processing did not affect ellagic acid glycosides and flavonol glycosides. However, the content of free ellagic acid increased 2.5-fold after processing. During 6 months of storage in the dark at 20°C, free ellagic acid continued to increase after the first month and then decreased slightly over the rest of the storage period. Ellagic acid glycosides did not show much variation in content with storage.

Processing methods led to no changes on vitamin C content and on antioxidant activity by DPPH nor FRAP assays (Table 1).

The manufacture of fruit juices or purees demands ascorbic acid during the crushing, straining, or pressing processes to prevent enzymatic browning of the raw fruits. Acting as an antioxidant, ascorbic acid can inhibit browning reactions by reducing the quinones back to the original phenol compounds. Light and high temperature are also factors of oxidation

and degradation of vitamin C. When fruit derivatives are produced under refrigeration, control of light and lower production time, vitamin preservation can be improved.

Koplotek et al. (2005) evaluated the effects of processing in antioxidant properties of strawberries juice, nectar, wine and purée and observed a decrease in vitamin C content with production time and processing steps. Press process led to a loss of about 22% in vitamin C content. The main part of the total loss was caused by pomace removal (as compared to mash). Thermal processes led to losses of 28-35% of the vitamin.

Total anthocyanins and antioxidant capacity decreased during the use of high temperatures. Besides thermal unit operations effects on the decline of TPC, mashing and pressing resulted in TPC losses of 15 and 29%, respectively. The operations that lead to disintegration of cell structures make easier the contact among phenolic compounds, oxygen and browning enzymes such as peroxidase and polyphenoloxidase, which increases phenolics oxidation. Authors also observed a decrease in FRAP and TEA antioxidant capacities during processing. Passing the mash through a sieve was the step that caused the highest decrease in antioxidant capacity. As compared with the results obtained with the TEA assay, there were noticeable differences. The loss of the trolox equivalent antioxidant capacity was slighter and the process of making puree from mash did not result in significant changes.

According to Bakkalbai, Mente & Artik (2009), the structures of ellagitanins, abundant in strawberries, are characterized by the presence of several hydroxy functions in ortho positions and exhibit a higher ability to donate a hydrogen atom to free radicals to stabilize the unpaired electron, as compared to the low molecular weight polyphenols. Therefore, degradation of hydrolysable tannins occasioned by fruit metabolism or other factors may result in partial loss of antioxidant activity.

Amakura et al. (2000) evaluated effects of strawberry jam processing on phenolic contents and antioxidant capacity and reported an increase in DPPH-TAA during strawberry jam processing, with values expressed as fresh fruit equivalent. The result was strongly correlated to the contents of the selected phenolics caffeic acid, ellagic acid, myricetin, quercetin and kaempferol.

In the present work, DPPH-TAA presented significant Pearson correlation (Table 2) with TPC whereas FRAP-TAA was correlated to TPC, vitamin C and TEA contents. No correlation was observed between anthocyanins and TAA if both Pearson correlation is considered.

This result is in accordance with those found by Meyers, Watkins, Pritts & Liu (2003). It is stated that some important characteristics to the antioxidant activity of polyphenols are: (a) o-dihydroxy or catechol structure in B ring, resulting in high radical stability and helping electron delocation; (b) presence of 3-hydroxy group linked to C2-C3 double bond and adjacent to 4-oxo function in C-ring, responsible for delocation from the B-ring and (c) the presence of both 5- and 7- hydroxyl groups in A-ring with 4-oxo function in C-ring for maximal radical-scavenging capacity and strongest radical absorption (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1996). The absence or substitution of some of these structural characteristics causes the lowering or loss of antioxidant activity. Pelargonidin-3-glycoside, the major anthocyanin found in strawberries, lacks these structural features, and this could be the reason by which strawberry anthocyanins seems to show a low contribution to TAA.

3.5 Storage time effects in color

Lightness (Figure 1a), redness (figure 1b) and saturation (Figure 1c) decreased 15%, 16.3% and 20.7%, respectively, in frozen pulps after 30 days of storage, and remained the same until 120 days. An increase in lightness of 13.4% between 30 and 60 days was observed in jams, but no changes occurred in C^* . An increase of 19.7% in redness was noticed for jams between 90 and 120 days. Color characteristics in strawberries frozen pulps have been scarcely reported. Torreggiani (1999) evaluated frozen strawberry juices stored at -10°C and reported no changes in L^* until the fourth month. Authors also observed significant decrease in H° and increase in C^* after 8 months. According to Gössinger et al. (2009), an increase in C^* is due to copigmentation (interactions of anthocyanins with polyphenols). Copigmentation is associated with color stability and has a hyperchromic effect, causing a bathochromic shift (higher absorption maximum), which results in a violet appearing product. This effect, however, did not happen in the present study for any of the products.

For jams, García-Viguera et al. (1999) reported small changes in a^* values in the products stored at 20°C for 200 days in the darkness. Wojdylo et al. (2008) found average L^* values of 36.31 and 33.24, in Senga Sengana and Elkat strawberry jams, respectively. These values are higher than those found in the present study (27.84 ± 2.95). After six months of storage at 4°C , Senga Sengana jams were significantly darker, but no changes were verified for jams made with Elkat strawberries in the same period.

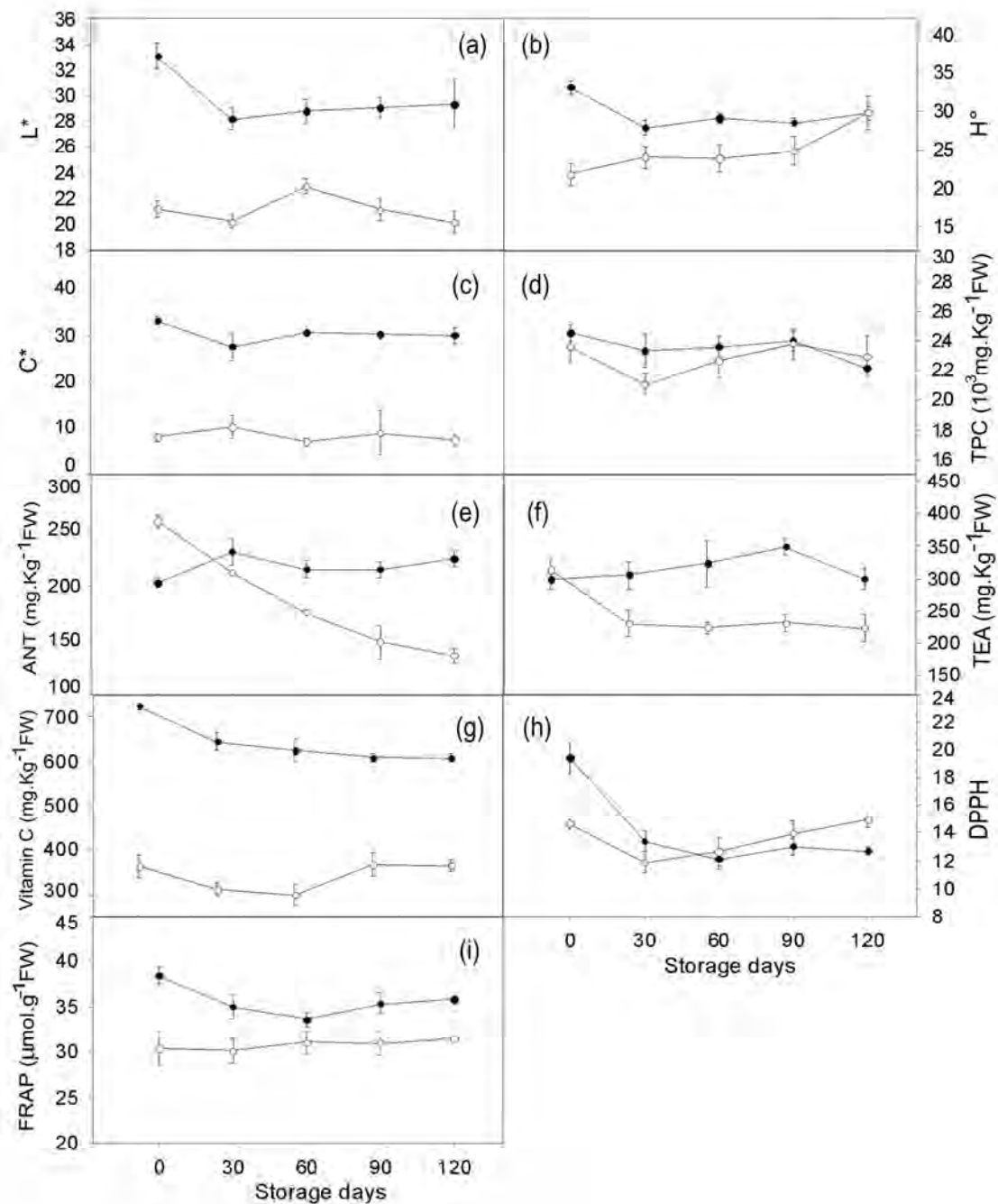


Figure 1 Color and antioxidant variables in 'Camino Real' strawberries jams and frozen pulps, stored for 120 days. Variables are (a) Lightness, (b) Hue angle - redness, (c) Chroma - saturation, (d) Total phenolic compounds (TPC), (e) Total Anthocyanins (ANT), (f) Total Ellagic Acid (TEA), (g) vitamin C, (h) DPPH-TAA and (i) FRAP-TAA. Treatments are: Frozen pulp (●) and jam (○).

Ngo et al. (2007) evaluated color changes of jams made from Totem genotype strawberries during storage at 10°C, 21°C, and 38°C for 9 weeks. The major increase in H° value occurred within the first 3 weeks of storage at 38°C whereas it took 9 weeks for changes in H° to become obvious at 21°C. At the same temperature, L* was higher after 3 weeks but a slight decrease in this variable was noticed until the end of storage time. Although trends of changes were similar, it is important to notice that the values of L*, C* and H° found by Ngo et al. (2007) using the ColorQUEST instrument (L* = 3.47 ± 0.31, C* = 12.46 ± 0.59 and H° = 12.46 ± 0.87) were different from those found in this work.

3.6 Storage time effects in antioxidants

No significant were observed in TPC (Figure 1d) during storage of frozen pulps and jams. Although no changes in total anthocyanins were noticed in strawberry pulps during storage, the content in jams after 120 days was 1.9-fold lower (Figure 1e).

No significant Pearson correlation was found between anthocyanins and L* or H°, but both correlation coefficients were significantly different of 0 between anthocyanins and C* (Table 2). Linear relationships between color data and pigments concentration are difficult to obtain. Degradation of free anthocyanins does not have an immediate impact on changes in visual color of products (Skrede, Wrolstad, Lea & Enersen, 1992).

Table 2 Pearson correlation matrix

	L	HUE	C	VITC	TPC	ANT	DPPH	FRAP	TEA
L	1	0,696	0,927	0,836	0,364	0,264	0,444	0,788	0,467
HUE	0,696	1	0,626	0,656	0,204	-0,221	0,490	0,642	0,184
C	0,927	0,626	1	0,755	0,482	0,403	0,358	0,705	0,398
VITC	0,836	0,656	0,755	1	0,194	0,033	0,470	0,900	0,655
TPC	0,364	0,204	0,482	0,194	1	0,305	0,511	0,280	-0,039
ANT	0,264	-0,221	0,403	0,033	0,305	1	-0,139	-0,038	0,245
DPPH	0,444	0,490	0,358	0,470	0,511	-0,139	1	0,621	0,053
FRAP	0,788	0,642	0,705	0,900	0,280	-0,038	0,621	1	0,498
TEA	0,467	0,184	0,398	0,655	-0,039	0,245	0,053	0,498	1

Black values are significantly different from 0 (p<0.05)

A significant decrease of 21.7% in TEA (Figure 1f) occurred between 90 and 120 days of storage for frozen pulps. TEA in jams were 26.8% lower after 30 days, but remained stable after this period until the end of storage.

Mullen et al. (2002) investigated how freezing and storage affected ellagitannins of red raspberries. Processing caused increases in ellagitanins and ellagic acid. However, a decline of 14-21% in ellagic acid content was observed during storage at -30°C for 12 months. Hakkinen, Kärenlampi, Mykkänen & Törrönen (2000) reported a decrease of 40% in ellagic acid of strawberries stored at -20°C for 9 months.

Vitamin C in frozen pulps decreased 12.5% after 30 days of storage. No further significant differences were verified after each 30 days, but overall loss of vitamin C in jams after 120 days of storage was 19.2%. Vitamin C in jams seemed to be stable during dark storage, if compared month by month. The most significant loss was noticed along the first 60 days of storage (Figure 1g).

DPPH-TAA was 44.8% lower in frozen pulps after 30 days. For jams, it was observed a reduction of 19.1% in the same period. However, it is worth to observe that no differences existed among antioxidant activity of jams at 0, 90 and 120 days of storage (Figure 1h). A loss of 14.9% FRAP-TAA was found between 0 and 30 days for frozen pulps and no changes has occurred along storage of jams for this variable (Figure 1g).

Wicklund et al. (2005) evaluated TAA of several strawberry cultivars jams stored at different conditions for 3 months. FRAP values found by these authors were much higher than those found in this work, being those values close to 130µmol ferrous sulphate.g⁻¹FW. FRAP stability observed by those authors was cultivar and storage temperature dependent. Light did not affect TAA or other studied variables of stored jams.

Wojdyjo et al. (2008) did not find changes in DPPH-TAA of 'Senga Sengana' strawberry jams before and after 6 months of storage, whilst for 'Elkat' jams DPPH-TAA was about 28.6% lower at the same time range. For FRAP-TAA, expressed in trolox equivalent, a decrease of 16% and 11% was reported for 'Senga Sengana' and 'Elkat' jams, respectively.

Although some changes in phenolics and vitamin C were noticed, the amounts of TPC and vitamin C for frozen pulps and jams during 120 days of storage can still be taken into account in both products to decide if they are in fact good sources of antioxidants.

Dietary Reference Intakes (DRI) for vitamin C (NAS, 2000) is nowadays 75mg for adult females and 90mg for males. One serving of 'Camino Real' frozen pulp (100g) from this study, frequently consumed as one glass of home made nectar, would provide from 81 to 97% of daily intake for females and from 67.4 to 81% for males, during 120 days of shelf life. One serving of 'Camino Real' strawberry jam (20g) presented contents to provide 16.5 to 19.3% and 13.7 to 16.1% of daily intake of vitamin C for females and males, respectively. It is important to consider the differences found for vitamin C for raw materials, which seemed to be more important than processing for nutritional characteristics and antioxidant contents in the case of frozen pulps and jams. It is also worth to note that one serving of this jam supplies about 11.5g of sugar. This intake must be considered into the limits of recommended daily intake for sugar, in a context of health eating. In WHO Technical Report series 916, it is recommended that this daily intake could not supply more than 10% of total calories intake (WHO, 2003).

According to Arabbi, Genovese & Lajolo (2004) the average daily ingestion of flavonoids by Brazilian population is about 60 to 106 mg/day. One serving of 'Camino Real' strawberry jam provided content close to 45-47mg of TPC. One serving of frozen pulp

presented TPC concentration of approximately 232-245mg. It is worth to consider that TPC are composed by flavonoids and phenolic acids. The relation between the contents of total flavonoids and TPC in seven cultivars of strawberries studied by Pinto et al. (2008) ranged from 11% to 18%.

3.7 Multivariate analysis

The differences between strawberry raw materials, processed products and storage time were emphasized during principal component analysis (PCA). Two main principal components (PC) (Figure 2) accounted for 71.95% of the total variability, being PC1 (55.46%) and PC2 (16.49%).

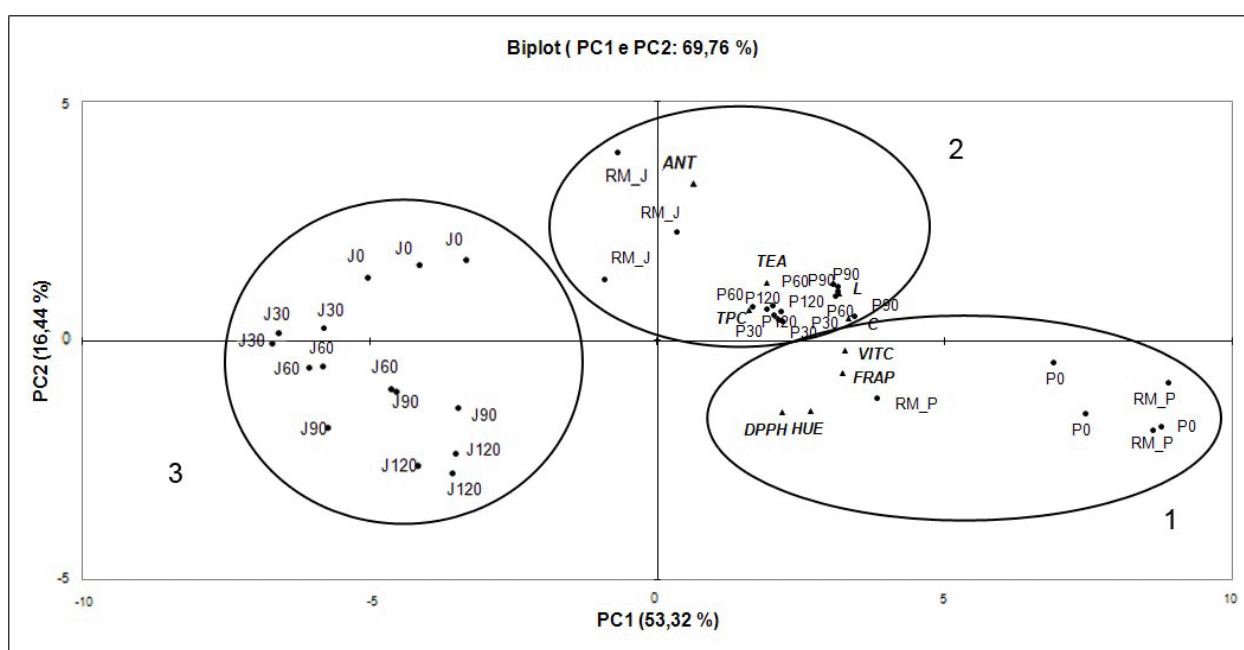


Figure 2 Principal Component Analysis of 'Camino Real' strawberries frozen pulps (P) and jams (J), stored for 120 days, and their raw materials (RM_P and RM_J). Variables: L*; H^o; C*; TPC-total phenolic compounds, gallic acid equivalent; TA-total anthocyanins, pelargonidin-3-glycoside equivalent; TEA-total ellagic acid; VITC-total vitamin C; total antioxidant activity by DPPH, BHT equivalent and FRAP, ferrous sulphate equivalent. Treatments are frozen pulp (●) and jam (○).

PC1 is primarily responsible for the differences in L*, C*, vitamin C and FRAP-TAA. PC2 is related to differences in anthocyanins, TEA, H^o and DPPH assay. When cluster analysis

was performed, three groups were built. Considering the main characteristics of each cluster (determined by the clusters centroids) it is possible to observe that cluster 1 (raw material for pulps and pulps at time 0) are associated to the highest levels of L*, C*, H^o, TPC, vitamin C, DPPH-TAA and FRAP-TAA. Cluster 2 (jams raw material and all pulps from 30 to 120 days of storage) are characterized primarily by the highest contents of anthocyanins and TEA and by the lowest DPPH antioxidant activity. The main attributes of cluster 3 (all the jams) are the lowest levels of antioxidant and color variables, with exception of DPPH assay, although value is very close to that of cluster 2. PCA confirmed best antioxidant characteristics of raw materials for frozen pulps, which could have influenced the best antioxidant qualities of this product.

Wojdyio et al. (2008) also performed PCA in their study with jams and observed, using biplot graphic, that samples could be distinguished in terms of proanthocyanins and antioxidant activity by ABTS, DPPH and FRAP assays whereas other samples were balanced for anthocyanins and ellagic acid.

4 Conclusions

'Camino Real' can be considered a good cultivar for frozen pulp and jam processing. Processing affected L*, C* and TEA contents in pulps, but all color variables, TPC, anthocyanins and TEA contents changed during jam processing. Color variables, TPC and TAA variables were more stable along storage if compared to other studied variables. Significant differences were found mainly after 30 days of storage. Raw material characteristics seemed to play a more important role in product quality variables than the sort of processing, for most variables. Although one serving of frozen pulp provided higher contents of antioxidants, jam can also be an interesting source of vitamin C and TPC in the

Brazilian diet, considering that processing and storage did not affected drastically their contents and antioxidant activities. If richer raw materials are used in jam production, it is possible that one serving of the product can contain considerably higher levels of antioxidants, mainly concerned to vitamin C concentrations.

Acknowledgments

Thanks to the strawberry grower José Ricardo Aléscio, for supplying the strawberries used in the study. To PPPG / UCB, National Council of Science and Technology (CNPq), Embrapa Vegetables and Ministry of Science and Technology, for the financial support.

5 References

- Amakura, Y.; Umino, Y.; Tsuji, S.; Tonogai, Y. (2000). Influence of Jam Processing on the Radical Scavenging Activity and Phenolic Content in Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6292-6297.
- Arabbi, P.R., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. (2004) Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1124–1131.
- Bakkalbai; E.; Mente O.; Artik N. (2009) Food Ellagitannins – Occurrence, Effects of Processing and Storage. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 283–298.
- Brunini, M.A.; Durigan, J.F.; Oliveira, A.L. (2002). Avaliação das alterações em da polpa de manga ‘Tommy-Atkins’ congeladas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24 (3), 651-653.
- Cordenunsi, B.R.; Genovese, M.I. ; Nascimento, J.R.O.; Hassimoto, N.M.A.; Santos, R.J.; Lajolo, F.M. (2005). Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chemistry*, 93 (1), 113-121.

Downing, D.L. (1996). Preserves (jams), jellies and related products. In: A complete course in canning and related processes—book III processing procedures for canned food products. 13th ed. Baltimore, Maryland: CTI Publications, Inc. p 385– 426.

Garcia-Viguera, C., Zafrilla, P., Romero, F., Abellan, P., Artes, F.; Tomas-Barberan, F.A. (1999). Color stability of strawberry jam as affected by cultivar and storage temperature. *Journal of Food Science*, 64(2), 243–247.

Gössinger, M.; Moritz, S.; Hermes, M.; Wendelin, S.; Scherbichler, H.; Halbwirth, H.; Stich, K.; Berghofer, E. (2009). Effects of processing parameters on color stability of strawberry nectar from puree. *Journal of Food Engineering*, 90, 171–178.

Häkkinen S.H., Kärenlampi S.O., Mykkänen H.M., Törrönen A.R. (2000). Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 2960–2965.

Halvorsen, B.L.; Holte, K.; Myhrstad, M.C.W.; Barikmo, I.; Hvattum, E.; Remberg, S.F.; Wold, A.; Haffner, K.; Baugerod, H.; Andersen, L.N.; Moskaug, J.O.; Jacobs, D.R.; Blomhoff, R.A (2002). Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants. *Journal of Nutrition*, 132, 461–471.

Kirka, A.; Özcan, M.; Lu, C. (2007). Storage stability of strawberry of jam color enhanced with black carrot juice concentrate. *Journal of Food Processing and Preservation*, 31, 531–545.

Klopotek, Y., Otto K.; Bohm, V. (2005). Processing strawberries of different products alters content of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 5640–5646.

Lee, K.S.; Kader, A.A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207–220.

Meyers, K.J.; Watkins, C.B.; Pritts, M.P.; Liu, R.H.(2003). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (23), 6887-6892.

Mullen W., McGinn J., Lean M.E.J., MacLean M.R., Gardner P., Duthie G.G., Yokota T., Crozier A. (2002). Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5191–5196.

National Academy of Sciences.Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. (2000). Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Available: http://www.nal.usda.gov/fnic/DRI//DRI_Vitamin_C/vitamin_c_full_report.pdf. Accessed march, 2009.

Ngo, T., Wrolstad, R.E., Zhao, Y. (2007). Color quality of Oregon strawberries—Impact of genotype, composition, and processing. *Journal of Food Science*, 72, C25–C32.

Nunes, M.C.N.; Brecht, J.K.; Morais, A.M.M.B.; Sargent, S.A. (1995). Physical and chemical quality characteristics of strawberries after storage are reduced by a short delay to cooking. *Postharvest Biology and Technology*, 6, 17-28.

Pinto, M.S.; Lajolo, F.M.; Genovese, M.I. (2008). Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 107, 1629-1635.

Rices-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7), 933-956.

Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Jimenez-Perez, J.; Saura-Calixto, F.D. (2006). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Fortaleza:

Embrapa Agroindústria Tropical, Available:
<www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/cot_125.pdf>

Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Jimenez-Perez, J.; Saura-Calixto, F.D. (2007). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. Available:
www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/Cot_127.pdf

Shaw, D.V.; Larson, K.D. (2002). Strawberry Plant named 'Camino Real'. United States Plant Patent. Patent no. US PP13,079P2. Oct. 15, 2002. Available at www.freepatentsonline.com/PP13079.html

Shin, Y., Liu R.H., Nockc, J.F.; Holliday, D., Watkins, C.B. (2007). Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 349–357.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.

Skrede, G., Wrolstad, R.E., Lea, P. Enersen, G. (1992) Color stability of strawberry and blackcurrant syrups. *Journal of Food Science*. 57(1), 172– 177.

Torreggiani, D. (1999). Modification of glass transition temperature through carbohydrates addition: effect upon color and anthocyanin pigment stability in frozen strawberry juices. *Food Research International*, 32, 441–446, 1999.

Wicklund, T.; Rosenfeld, H.J.; Martinsen, B.K.; Sundfor, W.; Lea, P.; Bruun, T.; Blomhoff, R.; Haffner, K. (2005). Antioxidant capacity and color of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. *Food Science and Technology*, 38, 387–391.

WHO Technical Report Series 916. *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases*, Geneva, 2003. Report of a Joint FAO/WHO expert consultation.

Wojdylo, A.; Oszmiański, J.; Bober, I. (2008). The effect of addition of chokeberry, flowering quince fruits and rhubarb juice to strawberry jams on their polyphenol content, antioxidant activity and color. *European Food Research and Technology*, 227:1043–1051.

Zafrilla, P., Ferreres, F., Tomás-Barberán F.A. (2001) Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 3651–3655.

CONCLUSÃO

Morangos 'Osogrande' e 'Camino Real', produzidos do Distrito Federal, podem ser considerados boas fontes de antioxidantes por fornecerem mais da metade do valor de ingestão diária recomendada de vitamina C em 100 gramas do produto e por apresentarem, na mesma porção, quantidade de compostos fenólicos que superam a ingestão estimada de flavonoides pela população brasileira. Foram observadas algumas variações em relação aos valores encontrados na literatura, principalmente no que diz respeito aos teores de antocianinas, vitamina C e ácido elágico de morangos 'Osogrande', não tendo sido encontrados dados para morangos 'Camino Real'. Com relação à comparação entre as cultivares avaliadas, maiores teores de antocianinas e de vitamina C e menores teores de fenólicos totais foram verificados para morangos 'Camino Real'. Embora frutos maduros sejam em geral mais atraentes, a atividade antioxidante é mais elevada no estágio $\frac{3}{4}$ maduro. Neste mesmo estágio, observaram-se maiores teores de fenólicos totais, ácido elágico total e de vitamina C, para ambas as cultivares.

Os frutos cultivados no Distrito Federal são, em geral, de boa qualidade inicial. Todavia, a velocidade de deterioração observada foi muito elevada e pacotes tecnológicos de produção, para minimização deste problema, precisam ser adotados pelos produtores da região.

Ficou evidente a importância da temperatura de armazenamento, quando são comparados resultados obtidos a 5 e a 15°C, sendo que a temperatura mais baixa acarretou leve redução nas taxas de deterioração. O aumento dos teores de antioxidantes a 15° C não pode ser visto como uma vantagem, uma vez que a maior concentração desses compostos está diretamente relacionada ao aumento do percentual de frutos com fungos e à perda de massa por desidratação. Mais estudos precisam ser conduzidos para

avaliação da associação de novas tecnologias pós-colheita, associadas à refrigeração, para que se possa estender a vida de prateleira dos morangos *in natura* e garantir a segurança sanitária. A queda da qualidade foi mais rápida para morangos 'Camino Real'. Por esse motivo, o processamento de frutos dessa cultivar foi avaliado como forma alternativa de redução das perdas pós-colheita e manutenção da qualidade nutricional.

Nenhuma das formas de processamento resultou em alterações drásticas em nenhum dos nutrientes. Os compostos mais afetados foram as antocianinas, sobretudo durante o armazenamento de geleia. Houve uma grande diferença nos teores de antocianinas, vitamina C e ácido elágico entre as matérias-primas. Vale destacar que os materiais foram colhidos em épocas diferentes e os morangos colhidos no pico da safra, usados para o processamento de geleia, estavam mais maduros. Logo, o estágio de maturação e as diferenças nas condições ambientais observadas entre julho e setembro de 2008 são as prováveis causas da variação observada. Essas diferenças foram refletidas na composição dos produtos processados e parece que a diferença, entre os produtos, está mais relacionada às diferenças entre os materiais processados do que entre as operações de transformação a que estes foram submetidos.

Apesar disso, concluiu-se que as polpas e as geleias processadas a partir de morangos 'Camino Real' fornecem quantidades relevantes de vitamina C e de compostos fenólicos, de acordo com as recomendações de ingestão preconizadas atualmente. Todavia, mais estudos *in vivo* precisam ser conduzidos, para definir a dose e a porção correspondente de cada produto, necessárias para exercer uma determinada propriedade de saúde, conferindo a estes produtos o direito de alegação desta propriedade. É importante notar que uma porção de 20 gramas de geleia fornece aproximadamente 11,5g de açúcar. Essa ingestão deve ser considerada dentro dos limites máximos

tolerados de consumo de açúcar, dentro de um contexto de hábitos alimentares saudáveis.

A agregação de valor à produção de morangos na forma de produtos processados colabora para a redução das perdas pós-colheita e do desperdício de alimentos, fortalecendo a cadeia produtiva. A redução das perdas por meio do processamento pode estimular a produção e aumentar a disponibilidade, também, de produtos *in natura* a preços mais acessíveis, graças ao aumento da oferta. A geração de emprego e renda para o pequeno produtor é de extrema importância no cenário da Política Nacional de Alimentação e Nutrição, em que se busca a segurança alimentar por meio do fortalecimento da agricultura familiar, e o aumento da disponibilidade de frutas e hortaliças, alimentos saudáveis, para toda a população, em diversas formas de consumo.

ANEXOS

ANEXO 1. MODELO DE FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

Adaptado de Shin et al. (2007) Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. Postharvest Biology and Technology, 45, 349–357.

Nome:

Data:

Por favor, avalie cada bandeja de morango e dê a nota que mais reflita a qualidade global do produto de acordo com a escala abaixo:

- 1 – INACEITÁVEL (> 50% da superfície mostrando injúria ou descoloração)
- 2 – RUIM (20-50% da superfície afetada)
- 3 – ACEITÁVEL (5-20% da superfície afetada)
- 4 – BOM (até 5% de superfície afetada)
- 5 – EXCELENTE (sem injúrias ou descolorações)

Código da amostra	NOTA
467	
283	
821	
165	
347	
509	
136	
790	
354	
492	
656	
078	

ANEXO 2 ANÁLISE DE UMIDADE PELO MÉTODO DA ESTUFA

Fonte: A. O. A. C. Method 16192. Official Methods of Analysis. Washington: Sidney Willians, 1980.

Material:

Cápsula de alumínio com tampas
Dessecador
Estufa – 103 °C a 105 °C
Balança analítica
Tenaz metálica
Espátula de pesagem

Procedimento

Retirar, com o auxílio da tenaz metálica, as cápsulas de alumínio que permaneceram na estufa, por 2 h, a 103 °C-105 °C.

Esfriar em dessecador por 15 minutos.

Pesar as cápsulas em balança analítica (4 casas) e anotar o peso.

Pesar cerca de 5 g de amostra em cada cápsula e anotar o peso da amostra úmida + peso da cápsula.

Levar as cápsulas à estufa, a 103 °C-105°C, por 2 h, ou à estufa a vácuo, até peso constante.

Tirar as cápsulas da estufa e esfriá-las em dessecador por 15 minutos.

Pesar e anotar os dados.

Repetir a operação até obter peso constante da amostra. A diferença entre duas pesagens pode ser de 0,0005.

Obs.: Não tocar as cápsulas com as mãos, pois as partículas de gordura poderão ficar impregnadas, dando erro de resultado. Utilizar sempre a tenaz metálica.

Cálculos

$$\% \text{ Umidade} = [(P_i - P_f) \times 100] / P_a$$

P_i = peso da cápsula + peso da amostra úmida (peso inicial em gramas)

P_f = peso da cápsula + peso da amostra seca (peso final em gramas)

P_a = peso da amostra úmida em gramas

Expressão dos resultados: gramas de umidade/100 gramas de amostra ou % de umidade

Porcentagem de sólidos totais (ST): $\% ST = 100 - \% \text{ Umidade}$

ANEXO 3 ANÁLISE DE ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL

Fonte: Shin et al. (2007) *Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. Postharvest Biology and Technology*, 45, 349–357.

Material

Béqueres de 100mL
Dessorador
Espátula
Balões de 100 mL
Béqueres de 250 mL

Procedimento

Preparar de solução NaOH a 0,1N (padronizar).

Espremer o fruto em dessorador de queijo, apertando com as mãos.

Pipetar (pipeta automática) 5mL de suco, colocar em balão de 100mL.

Anotar o peso do suco (fazer 3 análises de cada bandeja, triplicata).

Completar o balão com água destilada.

Transferir para béquer e titular sob agitação magnética até o pH 8,2, usando NaOH 0,1 N.

Anotar o volume gasto de NaOH.

Cálculo da acidez titulável:

$$\%TA = (mL \text{ NaOH} * N (\text{NaOH}) * 0.064) / m \text{ de suco (g)} * 100,$$

em que:

mL NaOH – volume gasto de NaOH

N NaOH – normalidade de NaOH

M de suco – massa dos 5mL de suco, em gramas

0,064: equivalente à massa do ácido cítrico, ácido orgânico predominante no morango

ANEXO 4 ANÁLISE DE VITAMINA C TOTAL

Fonte: NUNES, M.C.N.; BRECHT, J.K.; MORAIS, A.M.M.B.; SARGENT, S.A. *Physical and chemical quality characteristics of strawberries after storage are reduced by a short delay to cooking. Postharvest Biology and Technology*, 6: 17-28, 1995.

Material:

Homogeneizador de amostra
Espectrofotômetro
Centrífuga refrigerada
Vortex
Tubos falcon de 50mL
Espátula
Béquer de 100mL
Tubos de ensaio de 15mL
Bolas de gude para tampar tubos de ensaio
Pipetas automáticas (1mL, 10mL, 100uL)

Soluções:

1. Mistura ácida (MA):

HPO₃ (ácido metafosfórico) 6% contendo ácido acético 2N
60 g de ácido metafosfórico (HPO₃) → Triturado com martelo. A pedra fica envolvida em organza ou plástico.

120 g (≈ 115,3 mL) de ácido acético glacial (MM = 60,05; 99,7% w/w)

Água destilada (Vf = 1 L) (colocar água, mesmo sem completar p/ dissolver o ác. Metafosfórico)

Armazenar na geladeira por 7-10 dias.

2. 2,6 diclorofenolindofenol (DCPIP) 0,2%

200 mg de DCPIP

Água destilada (Vf = 100 mL)

Filtrar se necessário e armazenar em frasco escuro na geladeira

3. Tiourea 2% em HPO₃ 5%

4 g de tiourea

10 g de ácido metafosfórico

Água destilada (Vf = 200 mL)

Dissolver o HPO₃ em água destilada, acrescentar a tiourea e misturar.

Armazenar em frasco escuro na geladeira por até 2 meses.

4. Dinitrofenilhidrazina (DNPH) 2% em H₂SO₄ 9N

2,35 g de DNPH (MM = 198,14)

44,14 g de H₂SO₄ (MM = 98,08; 95 a 98% w/w)

Em um banho de gelo, dissolver o DNPH em H₂SO₄ devagar.

Completar o volume cuidadosamente (pela parede) com água destilada até 100 mL. → (Se fizer uma nuvem branca é por causa do H₂SO₄, o ideal é centrifugar)

Colocar bacia com gelo em cima de um agitador magnético na capela. Colocar o béquer (100mL, 50mL) com H₂SO₄ e a bailarina. Adicionar DNPH aos poucos.

A solução pode ser clareada com filtração ou centrifugação e armazenada por 2 semanas.

5. H₂SO₄ 90%

450 mL de H₂SO₄ + 50 mL de água destilada)

6. Solução padrão de ácido ascórbico (AA)

100 mg de ácido ascórbico em 100 mL de mistura ácida. Preparar na hora do uso.

Curva de Calibração

Diluição da solução padrão:

5 µg AA/mL = 50µL de AA + 9,95 mL de MA

10 µg AA/mL = 100µL de AA + 9,9 mL de MA

20 µg AA/mL = 200µL de AA + 9,8 mL de MA

30 µg AA/mL = 300µL de AA + 9,7 mL de MA

Procedimento

Pesar 1g do tecido fresco e misturar com 19mL de MA.

Centrifugar a 15,000 rpm por 20 minutos, a 4°C, e filtrar o sobrenadante.

Pipetar 1 mL, adicionar 50µL (1 gota) de DCPIP 0,2%, agitar e incubar à temperatura ambiente por 1 hora.

Adicionar 1 mL de tiouréia 2% e agitar bem.

Adicionar 0,5 mL de DNPH 2% (exceto no branco), misturar, tampar com bola de gude e deixar em banho-maria, a 60°C, por 3 horas (exceto o branco).

Colocar em banho de gelo e adicionar cuidadosamente 2,5 mL de H₂SO₄ gelado (inclusive no branco) e agitar, para dissolver o osazone (calor destroi DHA-osazone junto com osazones interferentes).

Adicionar 0,5 mL de DNPH 2% ao branco e agitar.

Ler a absorbância a 540 nm à temperatura ambiente.

ANEXO 5 ANÁLISE DE FENÓLICOS TOTAIS

Fonte: Fonte: Shin et al. (2007) Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. Postharvest Biology and Technology, 45, 349–357.

Material

Rotaevaporador
Homogeneizador de amostras
Espectrofotômetro com cubetas
Bomba de vácuo
Kitassato
Filtros whatman #1
Balão de rotaevaporação
Tubos de ensaio
Pipetas automáticas com ponteiros (100uL, 1mL, 10mL)

Soluções

1. Acetona 80%

Com auxílio de uma proveta, medir 800mL de acetona e transferir para um balão de 1L. Completar o volume com água destilada

2. Solução de carbonato de sódio a 7,5%

Pesar em um béquer de 100mL 7,5g de carbonato de sódio. Transferir para um balão de 100mL com auxílio de 1 funil e de água destilada. Lavar o béquer 3 vezes com pequenas porções da água destilada. Completar o volume.

Preparo do Extrato

Pesar 10 g da amostra (morango)
Homogeneizar com 100 mL de acetona a 80% em béquer alto usando filme PVC
Filtrar com papel filtro nº1 em funil de vidro
Rotaevaporar por +/- 20 a 30min
Retirar do balão e colocar a amostra em falcon
Levar para congelar no -80°C
Liofilizar as amostras ~2 a 3dias
Retirar do liofilizador, completar o volume do falcon para 10 mL com água destilada em balão volumétrico
Congelar a -80°C

Análise de Fenólicos Totais

Diluir o reagente Folin-Ciocalteu 1:10
Diluir a amostra 0,2 mL (0,0050µl do extrato + 195µl de água)
Pipetar 0,2 mL da amostra diluída
Pipetar 1 mL da solução Folin em cada repetição e no branco
Incubar por 1 minuto
Adicionar 0,8 mL de carbonato de sódio a 7,5%
Incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
Ler a absorbância a 765nm.

ANEXO 6 ANÁLISE DE ANTOCIANINAS TOTAIS

Fonte: Shin et al. (2007) *Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. Postharvest Biology and Technology*, 45, 349–357.

Material

Balança analítica
Espectrofotômetro com cubetas
Homogeneizador de amostras
Centrífuga refrigerada
Béquer de 600mL
Proveta de 50mL

Solução

1. Metanol 0,5% HCl

Com o auxílio de 1 pipeta de vidro de 1mL, medir 0,5 mL de HCl e transferir para balão de 100mL. Completar o volume com metanol.

Antocianinas no morango e na polpa

Preparar solução de metanol contendo HCl (0,5%, v/v)

Pesar 5 gramas de morango congelado

Triturar sob nitrogênio gasoso.

Pesar um grama de amostra e adicionar a 19mL de metanol contendo HCl (0,5%, v/v)

Deixar a 4°C por 60 minutos

Centrifugar a 17600 g por 15 min a 4°C

Ler a absorbância do sobrenadante a 515nm

Cálculo:

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/Kg)} = A \times PM \times FD \times 1000, \\ (\varepsilon \times 1)$$

em que:

A = Absorbância; PM = peso molecular

FD = Fator de diluição; ε = absortividade molar

A concentração final de antocianinas (mg/kg) é calculada com base no volume de extrato e peso da amostra. Expressa-se em cianidina -3-glicosídeo (PM=433,2 e $\varepsilon=36000$).

Antocianinas da Geleia

Preparar solução de metanol contendo HCl (0,5%, v/v)

Pesar um grama da geleia e adicionar a 19mL de metanol contendo HCl (0,5%, v/v)

Deixar a 4°C por 24 horas

Seguir o restante do procedimento para morango e polpa.

ANEXO 7 ANÁLISE DE ÁCIDO ELÁGICO TOTAL

Fonte: Pinto et al. (2008). *Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (Fragaria x ananassa Duch.)*. *Food Chemistry*, 107: 1629-1635.

Materiais:

Béquer de 200mL
Kitassato envolto em papel alumínio
Papel de filtro quantitativo
Balão de rotaevaporação (colocar nome no alto pois a glicerina tira a tinta da caneta)
Pipeta de 5mL com pêra
Tubo falcon
Espátula
Uma tira média e uma pequena de parafilm
Eppendorf
Funil de plástico pequeno
Identificar tudo o que for necessário antes de começar. Pegar, ainda:
1 funil para kitassato
1 proveta de 100mL para acetona
2 béqueres e 2 pipetas de 5mL e pera para o TFA e para o metanol (deixar tudo na capela, com estes reagentes)
Tenaz metálica
Tesoura
Caneta de retroprojctor
Béquer de 500mL para banho de gelo

Soluções:

1. Solução de Ácido Trifluoracético - TFA 2N:
Medir 77,041mL de TFA e completar o volume para 500mL com água ultrapura.
2. Solução de acetona 80%
Medir 800 mL de acetona e completar o volume para 1L com água ultrapura.

Procedimento:

Ligar banho a 60°C
Ligar banho com glicerina a 120°C com refluxo
Fazer gelo
Preparar 1 litro de acetona 80% para cada 10 amostras.
Pesar amostra liofilizada (0,5g, anotando peso exato) no béquer
Adicionar 50mL de acetona 80%
Bater no polytron em banho de gelo
Levar para a câmara fria por 1 hora
Filtrar a vácuo
com espátula, raspar amostra do papel de filtro para o béquer
Adicionar 25mL de acetona, escorrendo sobre o papel de filtro para ajudar a voltar a amostra para o béquer
Bater no polytron em banho de gelo por 1 minuto

Filtrar usando o mesmo papel de filtro e repetir (25mL de acetona e bate de novo, filtra, o papel de filtro deve estar branco após a 3ª. Extração. Importante: o kitassato fica sempre na câmara fria se precisar aguardar

Pipetar 2mL de extrato no balão de rotaevaporação. Guardar 10mL em flacon identificado e guarda no ultrafreezer imediatamente. Se precisar descongelar, transferir para câmara fria.

Secar os 2mL que estão no balão com nitrogênio gasoso (válvula do cilindro abre em sentido anti-horário e do regulador em sentido horário. FECHAR ambas assim que acabar de secar cada amostra!)

Adicionar 2mL de TFA 2N (colocar solução aos poucos num béquer e manter tampado com placa de petri)

Levar para hidrólise a 120oC com refluxo. Usar tenaz metálica para colocar e tirar o balão do banho de glicerina

Lavar o balão no banho a 60°C.

Levar para rotaevaporar a 90°C ou mais, colocar saco preto sobre o balão para proteger da luz.

Quando estiver sem seco mas sem queimar, retirar o balão e adicionar 1mL de metanol, com ajuda de um funil transferir para o eppendorf e guardar no ltrafreezer. Quando for analisar, descongelar na CF, filtrar em milipore 0,22µm, transferir o extrato para um vial.

Determinação em CLAE

Solvente A: água:tetrahidrofurano:ácido trifluoracético (98:2:0,1)

Solvente B: acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min e absorbância de 260nm.

Gradiente

Tempo 0 a 2 min: 17% B

Tempo 2 a 7 min: 25% B

Tempo 7 a 15 min: 35%B

Tempo 15 a 20min: 50%B

Tempo 20 a 25min: 35% B

Tempo 25 a 30min: 17% B

A identificação do ácido elágico é feita por comparação com o tempo de retenção do padrão de ácido elágico código EE250 (Sigma, USA).

ANEXO 8 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL POR DPPH

Fonte: Rufino et al. (2007). *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007 (Comunicado Técnico).

1- Curva de calibração de DPPH:

Materiais

Béquer de 10mL
 Metanol
 Balão de 100mL
 Espectrofotômetro
 Cubetas
 Pipetas (P10mL)
 Balão de 10mL
 DPPH
 Extrato obtido na análise de fenólicos totais

Procedimento

Pesar 0,0024g de DPPH em béquer de 10 mL;
 Transferir quantitativamente (lavar o bécker com metanol 3 vezes) para balão de 100mL (concentração 0,06mM);
 Completar o volume;
 Preparar soluções da curva padrão de acordo com a Tabela 1

Tabela 1: curva padrão de DPPH:

Solução de DPPH (mL)	Álcool metílico (mL)	Concentração final do DPPH (µM)
0	10	0
1,7	8,3	10
3,3	6,7	20
5	5	30
6,7	3,3	40
8,3	1,7	50
10	0	60

Fonte: Rufino et al., (2007).

2- Determinação da Curva do DPPH

Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de, aproximadamente, 4 mL de cada solução de DPPH (10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM e 60 µM) para cubetas de vidro e realizar a leitura em espectrofotômetro a 517nm. Utilizar álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro.

Plotar as concentrações de DPPH (µM) no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y e calcular a equação da reta.

3- Determinação da atividade antioxidante total

Materiais

Metanol
Espectrofotômetro
Cubetas
Pipetas (P10mL e P100)
Tubos de ensaio
Solução de DPPH
Vortex

Tubo controle:

0,1mL de água e 3,9mL de DPPH 0,06mM.

Ler a absorbância do controle.

4- Determinação do tempo E_{c50}

A partir do extrato obtido na análise de fenólicos totais, preparar em tubos de ensaio no mínimo três diluições diferentes em triplicata.

Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (item solução de DPPH 0,06 mM) e homogeneizar em agitador de tubos.

Utilizar 0,1 mL da solução controle (item solução controle de álcool metílico, acetona e água) com 3,9 mL do radical DPPH e homogeneizar.

Utilizar álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As leituras (517nm) devem ser monitoradas a cada minuto, onde é observada a redução da absorbância até sua estabilização. A leitura da absorbância final para o cálculo do E_{c50} só deve ser feita após a estabilização da absorbância (tempo E_{c50}).

Para experimentos posteriores, com uma mesma fruta, a leitura pode ser feita apenas no tempo estabelecido anteriormente (tempo E_{c50}), acompanhado, também, da leitura inicial do controle.

Análise definitiva de ATT em morangos pelo tempo $EC = 25min$, encontrada em nossos ensaios, coincidiu com o valor usado por Pinto et al. (2008)

5- Curva de BHT

Materiais

Metanol
Espectrofotômetro
Cubetas
Pipetas (P10mL e P100)
BHT
Béquer de 10mL
Balão de 50mL
Solução de DPPH

Procedimento

Pesar 0,010g de BHT em béquer de 10mL;

Transferir quantitativamente (lavar 3 vezes com metanol)

Completar o volume (balão de 50mL). Esta é a solução mãe.

Curva

Diluir a solução mãe, obtendo-se as seguintes concentrações:

0,2mg/mL: pipetar 10mL de BHT e 0mL de metanol;

0,15mg/mL: pipetar 7,5mL de BHT e 2,5mL de metanol;

0,10mg/mL pipetar 5mL de BHT e 5mL de metanol;

Cada diluição deverá ser pipetada e lida em triplicata.

Usar 4 cubetas, sendo 1 para o branco

Branco = 0,1mL de BHT + 3,9mL de metanol (cada concentração tem seu branco).

Nas outras cubetas:

0,1mL da solução de BHT + 3,9mL de DPPH 0,06mM

Incubar por 25min a 25°C. Ler a absorbância após 25min.

Repetir o procedimento para as demais concentrações.

6- Curva dos extratos

Dos extratos aquosos de fenóis totais, fazer as seguintes diluições:

100 → 2160µL de H₂O: 240µL da amostra;

50 → 1000µL de H₂O: 1000µL da amostra 100;

25 → 1000µL de H₂O: 1000µL da amostra 50.

Usar 4 cubetas, sendo 1 para o branco

Branco = 0,1mL da amostra 50 + 3,9mL de metanol

Pipetar 3,9mL de DPPH + 0,1mL de cada diluição do extrato.

Incubar por 25min a temperatura ambiente.

Ler a absorbância a 517nm.

ANEXO 9 ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL POR FRAP

Fonte: Rufino et al. 2006. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006 (Comunicado Técnico).

Material:

Espectrofotômetro

Tubos de ensaio

Pipetas automáticas (100uL, 1mL, 10mL)

Béqueres de 50 e 100mL

Extrato previamente preparado para análise de fenólicos totais.

Soluções

1. Solução de Metanol a 50%

Adicionar 500 mL de álcool metílico, em balão volumétrico de 1 L

Completar o volume para 1.000 mL com água destilada,

Homogeneizar e transferir para um frasco de vidro devidamente etiquetado. Armazenar em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

2. Solução de HCl 40 mM

Adicionar 3,34 mL de HCl concentrado, em balão volumétrico de 1 L

Completar o volume para 1.000 mL com água destilada

Homogeneizar e transferir para um frasco de vidro devidamente etiquetado Armazenar em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

3. Solução de TPTZ 10 mM

Dissolver 3,12 g de TPTZ em, aproximadamente, 5 mL de HCl 40 mM

Completar o volume para 1 L em um balão volumétrico com HCl 40 mM, Homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente etiquetado. Armazenar sob refrigeração por até um mês.

4. Solução de Cloreto Férrico 20 mM

Dissolver 5,4 g de cloreto férrico em água destilada

Completar o volume para 1 L em um balão volumétrico com água destilada, Homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente etiquetado. Armazenar sob refrigeração por até um mês.

5. Tampão Acetato 0,3 M, pH 3,6

Dissolver 3,1g de acetato de sódio em 16 mL de ácido acético glacial

Completar o volume para 1 L em um balão volumétrico com água destilada, Homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente etiquetado. Armazenar em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

6. Solução do Reagente FRAP

O reagente FRAP é obtido a partir da combinação

25 mL de tampão acetato 0,3 M,

2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e

2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM

Usar imediatamente após sua preparação.

7. Solução Padrão de Sulfato Ferroso 2 mM

Dissolver 27,8 mg de sulfato ferroso em água destilada
Completar o volume para 50 mL em um balão volumétrico com água destilada,
Homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente etiquetado.
Preparar e usar apenas no dia da análise.

Curva-Padrão do Sulfato Ferroso

Preparo das soluções

A partir da solução padrão de sulfato ferroso (2.000 μM), preparar em balões volumétricos de 10 mL, soluções variando a concentração de 500 μM a 1500 μM , conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Preparo das soluções para curva-padrão

Solução padrão de sulfato ferroso (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (μL)
2,5	7,5	500
5,0	5,0	1000
7,5	2,5	1500
10	0	2000

Fonte: Rufino et al., 2006

Determinação da Curva-Padrão

Transferir, em ambiente escuro, uma alíquota de 90 μL de cada solução de sulfato ferroso (500 μM , 1.000 μM , 1.500 μM e 2.000 μM) para tubos de ensaio,

Acrescentar 270 μL de água destilada

Misturar com 2,7 mL do reagente FRAP

Homogeneizar em agitador de tubos e manter em banho-maria a 37°C.

Realizar a leitura (595 nm) após 30 minutos da mistura

Utilizar o reagente FRAP como branco para calibrar o espectrofotômetro.

Plotar em planilha as concentrações de sulfato ferroso (mM) no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y e calcular a equação da reta.

A partir da equação da reta, calcular a absorbância referente a 1000 mM de sulfato ferroso (Pulido et al., 2000), de acordo com a equação de regressão

$$y = ax + b$$

em que:

x = 1.000 μM de sulfato ferroso

y = Absorbância correspondente a 1.000 μM de sulfato ferroso

Determinação do FRAP

A partir do extrato obtido para análise de fenólicos totais, preparar em tubos de ensaio, no mínimo três diluições diferentes, em triplicata.

Transferir, em ambiente escuro, uma alíquota de 90 µL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio,

Acrescentar 270 µL de água destilada,

Misturar com 2,7 mL do reagente FRAP,

Homogeneizar em agitador de tubos e manter em banho-maria a 37°C.

Realizar a leitura (595 nm) após 30 minutos da mistura preparada

Utilizar o reagente FRAP como branco para calibrar o espectrofotômetro.

A partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos,

Plotar a absorvância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X.

Determinar a equação da reta.

Para calcular a AAT, deve-se substituir na equação da reta a absorvância equivalente a 1.000 µM do padrão sulfato ferroso. O valor obtido para o termo x (Eq. 2) corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de sulfato ferroso.

$$y = ax + b$$

em que:

y = Absorvância correspondente a 1.000 µM de sulfato ferroso

x = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de sulfato ferroso

A partir do resultado encontrado (x) na equação de regressão, dividir por 1.000 para ter o valor em g. O resultado final é calculado pela divisão de 1.000 (µM) pelo valor de X(g) e multiplicado por 1(g) para encontrar o valor final (Z) que é expresso em µM sulfato ferroso/g de fruta (porção comestível).

$$X(g) = x / 1.000$$

$$Z = 1.000 / X(g).1$$

APÊNDICE

Cromatogramas e espectros resultantes da análise de ácido elágico total

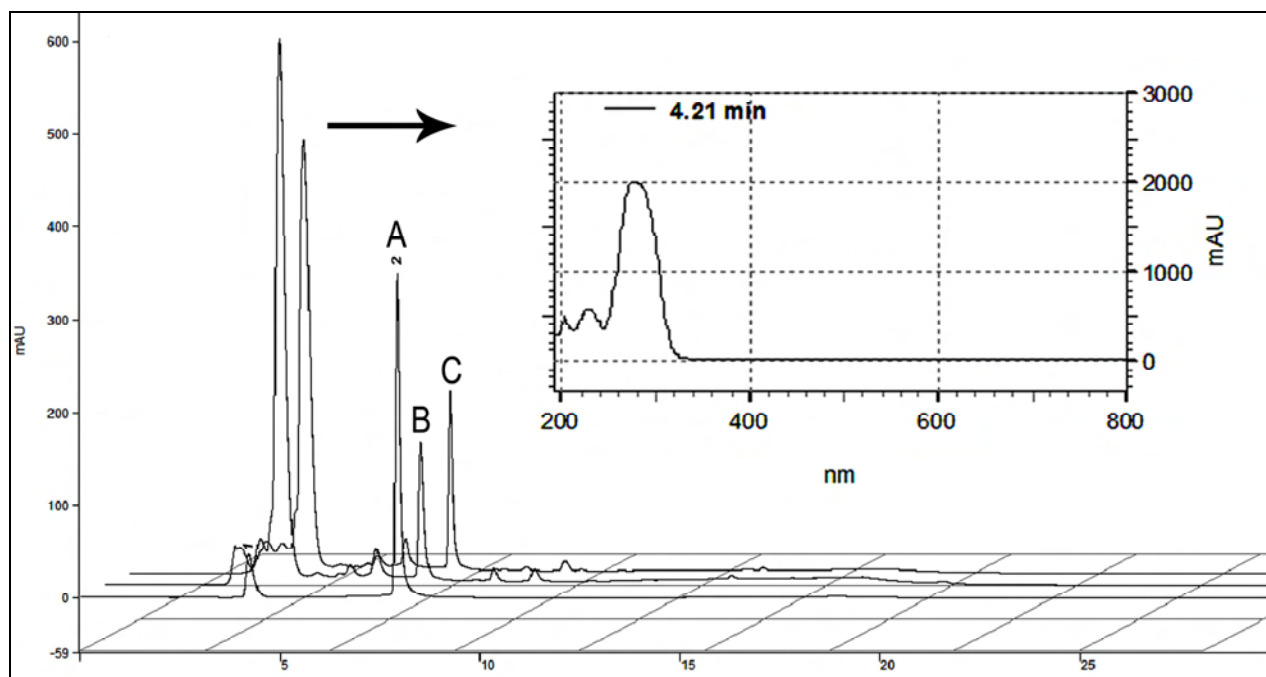


Figura 1. Cromatogramas de (A) soluções padrão de ácido gálico e ácido elágico $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, (B) morangos 'Camino Real' armazenados a 5°C no tempo inicial, (C) morangos 'Osogrande' armazenados a 5°C no tempo inicial. Os picos identificados são (1) ácido gálico ($\lambda_{\text{max}}=272\text{nm}$) e (2) ácido elágico. Picos no mesmo tempo de retenção de (1) nos cromatogramas (B) e (C) são, provavelmente, galoil glucose ($\lambda_{\text{max}}=278\text{nm}$), de acordo com espectro indicado pela seta, comparado com espectros desta substância apresentados na literatura.

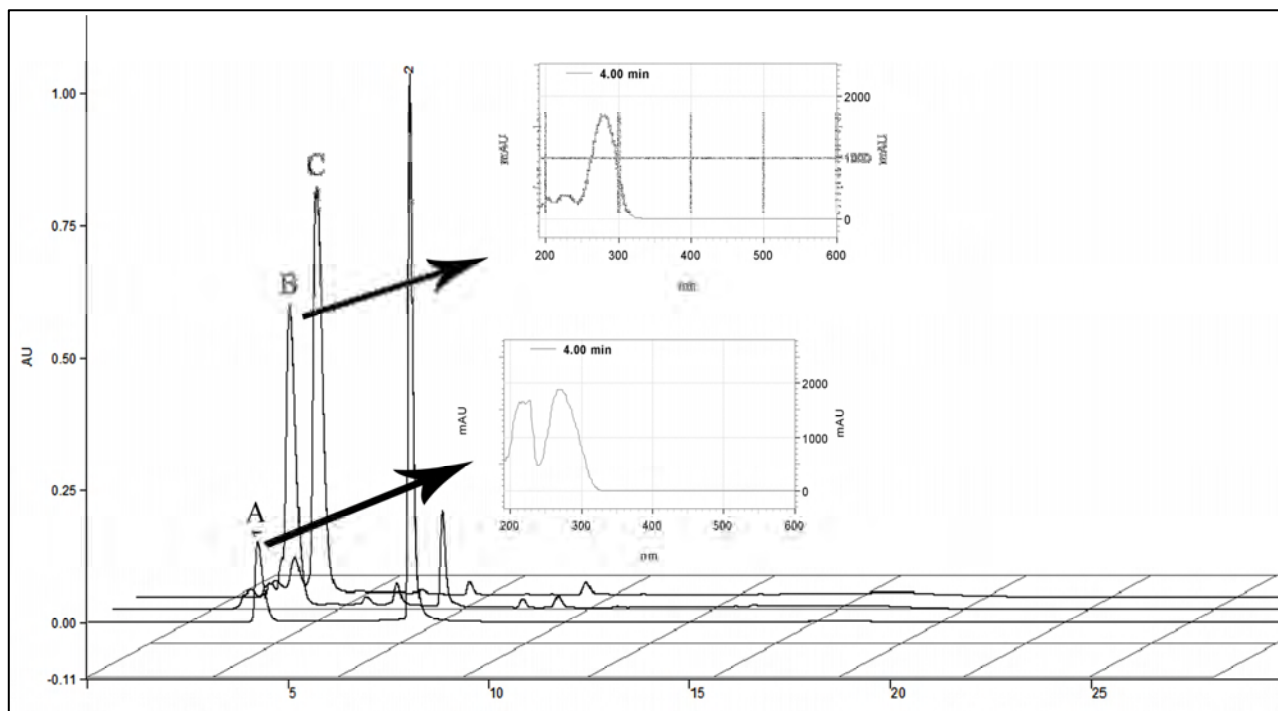


Figura 2 Cromatogramas de (A) soluções padrão de ácido gálico e ácido elágico 150 mg.kg^{-1} , (B) polpa congelada, no tempo inicial, (C) geleia, no tempo inicial. Os picos identificados são (1) ácido gálico ($\lambda_{\text{max}}=272\text{nm}$) e (2) ácido elágico. Picos no mesmo tempo de retenção de (1) nos cromatogramas (B) e (C) são, provavelmente, galoil glucose ($\lambda_{\text{max}}=278\text{nm}$), de acordo com espectro indicado pela seta, comparado com espectros desta substância, apresentados na literatura.

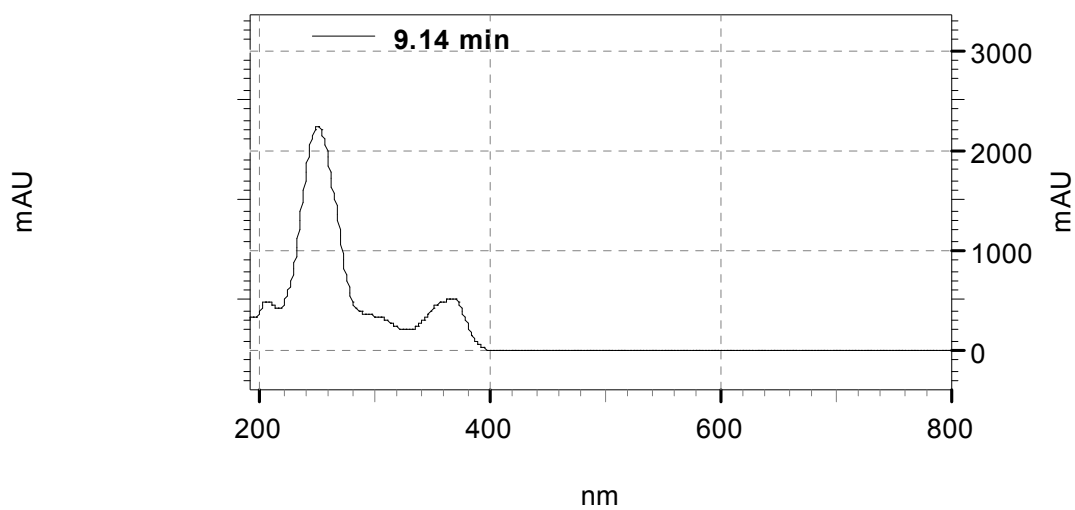


Figura 3. Espectro do ácido elágico, em solução padrão de $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

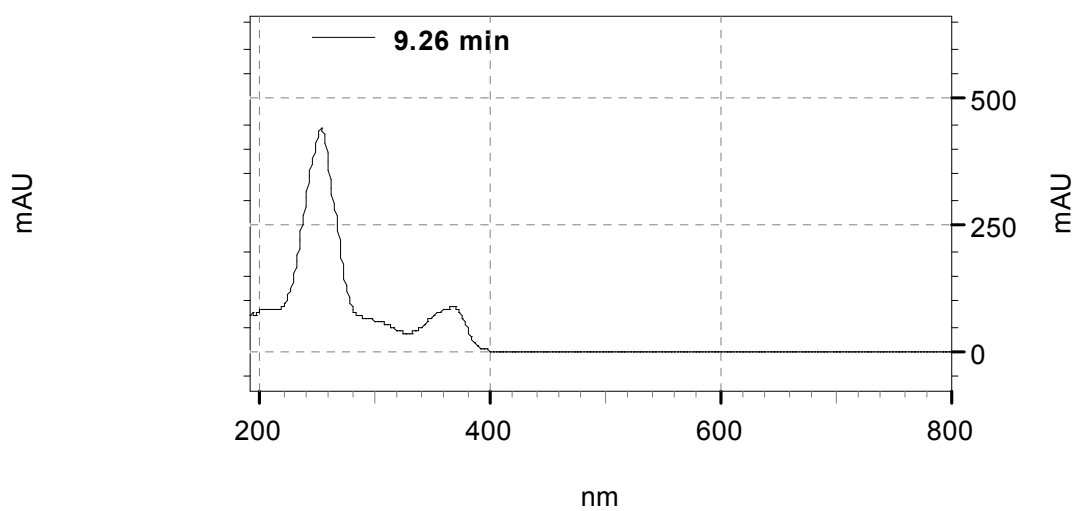


Figura 4. Espectro do ácido elágico em extrato hidrolisado de morangos 'Camino Real' armazenados a 5°C , no tempo inicial.