

Vitor Clasen Chaves

**TEOR DE ANTOCIANINAS, COMPOSTOS FENÓLICOS E
CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES DE
FRUTOS DE CULTIVARES DE MORANGUEIRO (*Fragaria x
ananassa* Duch.)**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-graduação em
Farmácia da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau
de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio
Henrique Reginatto

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Chaves, Vitor Glaeser
Teor de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade
de captação de radicais livres de frutos de cultivares de
morangoeiro (Fragaria x ananassa dca.) / Vitor Glaeser
Chaves ; orientador, Flávio Henrique Reginatto.
Florianópolis, SC, 2014.
105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Fragaria x ananassa. 3. Antocianinas.
4. DDFH. I. Reginatto, Flávio Henrique. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. III. Título.

Vitor Clasen Chaves

**TEOR DE ANTOCIANINAS, COMPOSTOS FENÓLICOS E
CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES DE
FRUTOS DE CULTIVARES DE MORANGUEIRO (*Fragaria x
ananassa* Duch.)**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2014.

Prof^ª. Dr^ª. Tânia Pasa
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Dr^ª. Eunice Oliveira Calvete
Universidade de Passo Fundo

Prof^ª. Dr^ª. Maique Weber Biavatti
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Jadel Kratz
Universidade Federal de Santa Catarina

Aos meus pais, Morenei e Tânia, e à
minha “namorada” Isabel.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Flávio Henrique Reginatto, pela confiança ao aceitar me orientar, pela orientação e não menos pela amizade, paciência e por todos os conhecimentos repassados.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina da qual fui aluno durante o período do mestrado.

Aos colegas do laboratório de Farmacognosia, pela ajuda, ensinamentos e também por todos os momentos de descontração no laboratório ou mesmo fora dele.

Às técnicas do laboratório Claudinha e Solange.

Aos meus pais, Morenei e Tânia, pelo apoio em todas as minhas decisões, e por propiciarem, em todos os sentidos, a conclusão das etapas da minha vida, especialmente esta.

Aos meus irmãos, Fábio e Daniel, pelo apoio, sempre presente, mesmo com a distância física envolvida.

À Isabel, que merece todos os agradecimentos, por sua paciência, dedicação e por estar sempre disposta a me ajudar nos mais diversos assuntos. Além do incentivo e da presença diária, que, certamente, são essenciais para o sucesso de todos os meus objetivos.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma espécie destinada à produção de frutos, os quais são consumidos mundialmente, seja na forma *in natura* ou através de produtos derivados. Os frutos de morango são classificados como frutos vermelhos, além de serem considerados como alimentos funcionais, visto que possuem diversas atividades biológicas estão relacionadas à presença de metabólitos secundários, em especial aos compostos fenólicos e as antocianinas. O presente trabalho teve como objetivo identificar e quantificar as antocianinas majoritárias presentes nos frutos de diferentes cultivares de morangos (Albion, Aromas, Camarosa, Camino Real, Monte Rey, Portola e San Andreas) por CLAE/DAD e pelo método do pH diferencial, bem como quantificar os compostos fenólicos, empregando as técnicas de Folin-Ciocalteu e Fast Blue BB. Os resultados indicaram que os cultivares apresentaram diferenças significativas quanto aos teores de compostos antociânicos, sendo o cultivar Camarosa o que possui a maior concentração de antocianinas. Nas análises por CLAE, a antocianina majoritária detectada em todos os cultivares foi pelargonidina-3-*O*-glicosídeo, com teores acima de 80% do total de antocianinas. Os resultados indicaram também uma forte correlação entre as técnicas de CLAE e pH diferencial ($r = 0,82$) para a quantificação de antocianinas. Para a quantificação dos compostos fenólicos também foi observada uma forte correlação entre as técnicas utilizadas ($r = 0,71$), sendo verificada a existência de diferença significativa nos teores entre os cultivares, com o cultivar Monte Rey apresentando a maior concentração de compostos fenólicos. Os resultados obtidos foram correlacionados com a capacidade de captação de radicais livres (DPPH). Foi observada forte correlação ($r = - 0,93$) entre os teores de antocianinas totais e os valores de EC_{50} . No entanto, a correlação entre os compostos fenólicos e a EC_{50} apresentou-se fraca ($r = - 0,48$). Com base nos dados apresentados a capacidade de captação de radicais livres está relacionada ao teor de antocianinas detectados nos cultivares.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa*. Antocianinas. DPPH.

ABSTRACT

The strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) is a species used for the production of fruits, which are consumed worldwide, either fresh or processed products. Strawberry fruits are classified as red fruits in addition to being considered as functional food, due to the fact that they have several biological activities, which are related to the presence of secondary metabolites, especially phenolic compounds and anthocyanins. The present study aimed at identifying and quantifying the major anthocyanins present in the fruits of different strawberry cultivars (Albion, Aromas, Camarosa, Camino Real, Monte Rey, Portola and San Andreas) by HPLC/DAD and pH-differential method, as well as identifying the phenolic compounds, using Folin-Ciocalteu and Fast Blue BB techniques. Results indicate that the cultivars presented significant differences for the content of anthocyanin compounds, with the Camarosa cultivar the one with the highest concentration of anthocyanins. In the HPLC analysis, the major anthocyanin detected in all cultivars was pelargonidin-3-*O*-glucoside, with content above 80% of the total anthocyanin content. Results also indicated a strong correlation between HPLC and pH-differential techniques ($r = 0,82$) for anthocyanin quantitation. Quantification of the phenolic compounds also revealed a strong correlation between the used techniques ($r = 0,71$), with the existence of significant difference for the contents among the studied cultivars, with the Monte Rey cultivar presenting the highest concentration of phenolic compounds. Results were correlated with the free radicals scavenging capacity (DPPH). A strong correlation ($r = -0,93$) between the total anthocyanins content and EC_{50} values, was observed. However, the correlation between phenolic compounds and EC_{50} was weak ($r = -0,48$). Based on the presented data, the capacity of free radical scavenging is related to the anthocyanins content of strawberry cultivars.

Keywords: *Fragaria x ananassa*. Anthocyanins. DPPH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morangueiro (<i>Fragaria x ananassa</i>).....	32
Figura 2 – Pseudofruto de <i>Fragaria x ananassa</i>	32
Figura 3 – 2-fenilcromano	36
Figura 4 – Estrutura química da pelargonidina.....	37
Figura 5 – Principais antocianidinas	38
Figura 6 – Estruturas de antocianinas em equilíbrio de acordo com o pH	40
Figura 7 – Exemplos das principais classes de metabólitos secundários encontrados em <i>F. x ananassa</i>	45
Figura 8 – Teores de antocianinas totais empregando diferentes concentrações de ácido clorídrico na solução metanólica extratora. Letras diferentes significam diferença estatística significativa (ANOVA, seguido por teste de Newman-Keuls; $p < 0,05$).	62
Figura 9 – Teores de antocianinas totais em diferentes relações de massa de fruto e volume de solução extrativa. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$)......	63
Figura 10 – Teor de compostos fenólicos totais pela técnica de Folin-Ciocalteu. Letras diferentes significam diferença estatística significativa (ANOVA, seguido por teste de Newman-Keuls; $p < 0,05$).	65
Figura 11 – Interação proposta entre o ácido gálico e o sal de diazônio Fast Blue BB.....	66
Figura 12 - Teor de compostos fenólicos totais pela técnica de Fast Blue BB. Letras diferentes significam diferença estatística significativa (ANOVA, seguido por teste de Newman-Keuls; $p < 0,05$).	67
Figura 15 - Teor de antocianinas monoméricas totais pelo método do pH diferencial. Letras diferentes significam diferença estatística significativa (ANOVA, seguido por teste de Newman-Keuls; $p < 0,05$).	71
Figura 17 - Gráfico representando o teor relativo de cada antocianina em função do total de antocianinas presente no extrato de frutos dos diferentes cultivares	76
Figura 19 – Comparação dos teores de antocianinas totais por cultivar entre as diferentes técnicas de quantificação utilizadas. Letras diferentes indicam diferença significativa (teste t de Student, $p < 0,05$)	83

Figura 20 – Correlação de Pearson entre os resultados obtidos nas análises de antocianinas totais por CLAE e pH diferencial ($r = 0,82$; $p < 0,0001$)	83
Figura 21 – Esquema estrutural da neutralização do radical DPPH..	85
Figura 22 – Correlação de Pearson entre os teores de antocianinas totais (CLAE) e valores de EC_{50} dos extratos dos frutos dos 7 cultivares ($r = - 0,9374$; $p < 0,0001$)	87
Figura 23 – Correlação de Pearson entre os teores de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e valores de EC_{50} dos extratos dos frutos dos 7 cultivares ($r = - 0,4893$; $p < 0,05$).....	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais compostos fenólicos descritos na literatura em frutos de morango.....	48
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de antocianinas totais em diferentes soluções extratoras não ácidas.....	62
Tabela 2 – Teor de antocianinas totais obtidas por diferentes tempos de extração.....	64
Tabela 3 – Absortividade molar descrita para pelargonidina-3- <i>O</i> -glicosídeo.....	70
Tabela 4 – Parâmetros de avaliação da linearidade	72
Tabela 5 - Análise do percentual de recuperação.....	73
Tabela 6 – Análise da repetibilidade e precisão intermediária.....	73
Tabela 7 – Limites de detecção e quantificação.....	74
Tabela 8 – Teores de antocianinas individualmente por CLAE nas diferentes cultivares	76
Tabela 9 – Teor de compostos fenólicos totais e antocianinas totais nos diferentes cultivares	84
Tabela 10 – Valores médios de EC_{50} de extratos de frutos dos diferentes cultivares.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AMT – Antocianinas monoméricas totais
ANOVA – Análise de variância
A_{AM}+P_{AD} – Área do pico da amostra + área do pico do padrão
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CV – Coeficiente de variação
UV – Ultravioleta
DAD – Detector por arranjos de diodos
DPPH – 2,2 difenil-1-picrilhidrazil
DPPH-H – 2,2 difenil-1-picrilhidrazil reduzido
EAG – Equivalente de ácido gálico
EC – Eletroforese capilar
EC₅₀ – Concentração necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH
EP – Equivalente de pelargonidina-3-O-glicosídeo
FBBB – Fast blue BB
FC – Folin-Ciocalteu
FD – Fator de diluição
FF – Fruto fresco
HCl – Ácido clorídrico
HDL – Lipoproteína de alta densidade
ILSI – *International Life Sciences Institute*
L – Caminho ótico
LD – Limite de detecção
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LQ – Limite de quantificação
NaOH – Hidróxido de sódio
Na₂CO₃ – Carbonato de sódio
NMBA – N-nitrosometilbenzilamina
ORAC – Capacidade de absorção dos radicais oxigenados
PM – Peso molecular
r – Coeficiente de correlação
r² – Coeficiente de determinação
TFT – Teor de fenólicos totais
UV-B – Ultravioleta B
UV-Vis – Ultravioleta - Visível
ε – Coeficiente de absorvidade molar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3	REVISÃO DA LITERATURA	31
3.1	ALIMENTOS FUNCIONAIS	31
3.2	<i>FRAGARIA X ANANASSA</i> DUCH.....	31
3.2.1	Aspectos botânicos e fisiológicos	31
3.2.1.1	Cultivares	33
3.2.1.1.1	<i>Cultivar Albion</i>	34
3.2.1.1.2	<i>Cultivar Aromas</i>	34
3.2.1.1.3	<i>Cultivar Camarosa</i>	34
3.2.1.1.4	<i>Cultivar Camino Real</i>	34
3.2.1.1.5	<i>Cultivar Monte Rey</i>	35
3.2.1.1.6	<i>Cultivar Portola</i>	35
3.2.1.1.7	<i>Cultivar San Andreas</i>	35
3.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	35
3.3.1	Antocianinas	36
3.3.1.1	Características químicas.....	37
3.3.1.2	Estabilidade.....	40
3.3.1.3	Copigmentação.....	41
3.3.1.4	Métodos de extração, identificação e quantificação.....	42
3.3.2	Metabólitos secundários em <i>Fragaria x ananassa</i> Duch. ..	44
3.4	ATIVIDADES BIOLÓGICA.....	50
3.4.1	Estresse oxidativo	50
3.4.1.1	<i>DPPH</i>	51
3.4.2	Câncer	51
3.4.2.1	Atividade citotóxica	51
3.4.2.2	Ensaio <i>in vivo</i>	52
3.4.3	Síndrome metabólica	53
4	METODOLOGIA	55
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	55
4.2	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO.....	55
4.3	ANÁLISE DOS TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS (TFT)	55
4.3.1	Folin-Ciocalteu	56
4.3.2	Fast Blue BB	56
4.4	ANÁLISE DOS TEORES DE ANTOCIANINAS TOTAIS	56
4.4.1	Método pH diferencial	56

4.4.2	CLAE	57
4.4.2.1	Validação dos parâmetros analíticos.....	58
4.4.2.1.1	<i>Faixa de linearidade</i>	58
4.4.2.1.2	<i>Exatidão</i>	58
4.4.2.1.3	<i>Precisão</i>	59
4.4.2.1.4	<i>Especificidade</i>	59
4.4.2.1.5	<i>Limite de detecção e quantificação</i>	59
4.5	CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES (DPPH)	60
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO	61
5.1.1	Líquido extrator.....	61
5.1.2	Relação massa de fruto e volume de líquido extrator	63
5.1.3	Tempo de extração.....	63
5.2	TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM FRUTOS DE <i>FRAGARIA X ANANASSA</i>	64
5.2.1	Método de Folin-Ciocalteu	65
5.2.2	Método Fast Blue BB.....	66
5.2.3	Comparação das técnicas FC e FBBB.....	67
5.3	TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS EM FRUTOS DE <i>FRAGARIA X ANANASSA</i>	69
5.3.1	pH diferencial.....	69
5.3.2	Análise por CLAE.....	71
5.3.2.1	Validação dos parâmetros analíticos.....	72
5.3.2.1.1	<i>Faixa de linearidade</i>	72
5.3.2.1.2	<i>Exatidão</i>	72
5.3.2.1.3	<i>Precisão</i>	73
5.3.2.1.4	<i>Especificidade</i>	73
5.3.2.1.5	<i>Limites de Detecção e Quantificação</i>	74
5.3.2.2	Teor de antocianinas	74
5.4	CULTIVARES X COMPOSIÇÃO QUÍMICA	78
5.4.1	Albion.....	78
5.4.2	Aromas.....	79
5.4.3	Camarosa.....	79
5.4.4	Camino Real.....	80
5.4.5	Monte Rey.....	81
5.4.6	San Andreas	81
5.4.7	Portola.....	82
5.5	COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CLAE E PH DIFERENCIAL	82

5.6	COMPARAÇÃO DOS TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS E ANTOCIANINAS TOTAIS ENTRE OS CULTIVARES....	84
5.7	CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES (DPPH).....	85
6	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS.....	91

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida e a busca por hábitos alimentares mais saudáveis têm levado ao consumo de alimentos que supram não apenas as necessidades nutricionais básicas, mas também visem a prevenção de algumas patologias (KAUR; DAS, 2011). Nesse contexto, estão inseridos os alimentos funcionais, os quais são capazes de reduzir o risco de doenças crônicas, como câncer, obesidade, e algumas patologias cardiovasculares (YILDIZ; EYDURAN, 2009).

Os frutos vermelhos estão em destaque, devido à grande aceitação, primeiramente por seu sabor, aparência e aroma, e também pela presença majoritária de compostos fenólicos, os quais estão intimamente associados a diversas atividades farmacológicas, principalmente à prevenção de doenças crônicas (AABY et al., 2012).

Dentre os frutos vermelhos, o morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é conhecido e consumido mundialmente, seja em sua condição *in natura* ou na indústria alimentícia, nas formas de sucos, geleias e iogurtes (CEREZO et al., 2010). Frutos de *F. x ananassa* possuem grande importância econômica não apenas para a indústria, mas, principalmente, para a cadeia agroalimentar, visto que normalmente são produzidos por pequenos produtores e cultivados em áreas inferiores a um hectare (1 ha), na grande maioria visando a atender o mercado interno (ANTUNES et al., 2007).

A América do Sul teve um crescimento significativo na produção de morango nos últimos 10 anos, em especial o Brasil, onde é estimado que essa espécie seja cultivada em uma área de, aproximadamente, 3.500 ha (ANTUNES; PERES, 2013).

O fotoperíodo e a temperatura são os principais fatores que afetam as espécies de morango e, dessa forma, os cultivares podem ser divididos de acordo com a necessidade de exposição à luz para florescimento, sendo classificados em cultivares de dias curtos, neutros e longos (FRANQUES, 2009). Dentre eles, destacam-se os cultivares de dias curtos, ou seja, cultivares que necessitam de um curto período diário de exposição à luz para frutificação, e os de dias neutros, os quais não dependem do fotoperíodo para frutificar, motivos pelos quais são cultivados no Brasil e asseguram a produção de forma anual (BORDIGNON JR, 2008).

Porém, não apenas aspectos adaptativos são distintos nesses cultivares, mas também a composição química pode ser afetada, fator que não é considerado pelos consumidores para a seleção dos frutos, visto que a escolha para o consumo é realizada com base no tamanho, na firmeza e na cor (ANTUNES; PERES, 2013; ORNELAS-PAZ et al., 2013).

Os compostos fenólicos são os principais metabólitos secundários presentes nos frutos de *Fragaria x ananassa*, mais especificamente ácidos fenólicos e flavonoides (KOSAR et al., 2004). Dentre os flavonoides, podemos ressaltar as antocianinas, as quais são responsáveis pela cor brilhante dos frutos, além de grande parte da capacidade antioxidante que lhe é conferida. As antocianinas são encontradas em diferentes órgãos nos vegetais, como raízes, caules, folhas, e, especialmente, em flores e frutos (DE PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLESTA, 2008).

A forma estrutural desses compostos está intimamente relacionada com o pH do meio no qual está inserida, sendo a faixa de pH de 1 a 2 a responsável pela estabilização das antocianinas, em que ocorre o predomínio de um cátion, conhecido como cátion flavílio, que confere maior estabilidade aos compostos antociânicos (BUENO et al., 2012).

Estudos têm demonstrado a capacidade das antocianinas em agir, prevenindo doenças relacionadas ao processo conhecido como estresse oxidativo, devido à condição dos compostos fenólicos em neutralizar radicais livres. Sendo assim, muitos trabalhos utilizam técnicas *in vitro* para simular a característica antioxidante de diversos compostos, como a técnica da captação de radicais livres do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), a qual é capaz de demonstrar a capacidade de certos compostos em doar elétrons a radicais altamente reativos (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Dessa forma, o conhecimento da composição química e sua correlação com a capacidade de captação de radicais livres nos frutos de morango, e a conseqüente potencial condição de prevenção de doenças crônico-degenerativas tornam a investigação da composição química entre os cultivares relevante, permitindo, assim, que os frutos possam ser selecionados não apenas com base em sua produtividade e aparência, mas também nos possíveis efeitos benéficos à saúde humana.

Neste trabalho são descritos dados referentes aos teores de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e majoritárias presentes nos frutos de *Fragaria x ananassa*, além da correlação existente entre os metabólitos citados e a capacidade de captação de radicais livres dos extratos dos frutos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) capaz de identificar e quantificar antocianinas presentes em frutos de sete cultivares de *Fragaria x ananassa* Duch., visando ao estabelecimento de parâmetros para a seleção de cultivares com altos teores desses compostos e avaliar a influência da composição química na capacidade de captação de radicais livres (DPPH).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Otimizar um método capaz de extrair, de forma exaustiva, os compostos de interesse.
- ✓ Determinar os teores dos compostos fenólicos totais presentes nos frutos de *F. x ananassa* por meio das técnicas de Folin-Ciocalteu e Fast Blue BB.
- ✓ Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise e doseamento de antocianinas nos cultivares de morango investigados (Albion, Aromas, Camarosa, Camino Real, Monte Rey, Portola e San Andreas).
- ✓ Determinar os teores de antocianinas monoméricas totais nos extratos de frutos dos sete cultivares de *F. x ananassa* através da metodologia do pH diferencial.
- ✓ Avaliar a capacidade de captação de radicais livres dos extratos de frutos de *F. x ananassa* pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

A alimentação, nas últimas décadas, vem sendo discutida e estudada como uma das grandes fontes de prevenção de doenças. Sendo assim, a relação entre alimentação e saúde tem levado a estudos mais aprofundados com a finalidade de descobrir os possíveis efeitos benéficos de certos alimentos (KAUR; DAS, 2011; YILDIZ; EYDURAN, 2009).

O conceito de alimento funcional foi desenvolvido na década de 1980, no Japão, pela indústria alimentícia, com a finalidade de descrever alimentos enriquecidos com ingredientes que visavam a benefícios à saúde (KHAN et al., 2013). No mundo existem distintas definições sobre alimentos funcionais, e as respectivas legislações são muito restritas. Dessa forma, a definição do *International Life Sciences Institute (ILSI)* é a mais comumente adotada. Segundo o ILSI, um alimento é considerado como funcional após demonstrar funções benéficas ao organismo, promovendo a saúde, além de desempenhar seu papel nutricional básico. Muitas outras denominações são atribuídas aos alimentos que possuem características iguais ou similares aos alimentos funcionais, dentre as quais podemos citar os nutracêuticos e os suplementos alimentares, os quais possuem como conceito central a promoção do bem-estar, da saúde ou, ainda, a redução dos riscos de doenças crônicas (RODRIGUES et al., 2012).

Os alimentos funcionais podem ser classificados em quatro grupos distintos: o primeiro inclui os alimentos naturalmente ricos em compostos biologicamente ativos ou seus subprodutos. No segundo grupo, estão enquadrados os alimentos que, apesar de o conhecimento científico a respeito da sua constituição química ser conhecido, não possuem confirmação de seus efeitos benéficos à saúde. Em um terceiro grupo estão inseridos os alimentos enriquecidos, que visam aumentar os teores de um componente com associação à prevenção ou tratamento de certa patologia. Por fim estão os alimentos integrais, aos quais está associada a redução do risco de doenças como as relativas ao trato gastrointestinal (KHAN et al., 2013).

3.2 *Fragaria x ananassa* Duch.

3.2.1 Aspectos botânicos e fisiológicos

Fragaria x ananassa Duch., popularmente conhecido como morangueiro, pertence à família Rosaceae e gênero *Fragaria*, sendo que a variedade atualmente utilizada na alimentação humana é um híbrido

resultante do cruzamento espontâneo das espécies *Fragaria chiloensis* e *Fragaria virginiana*, (CALVETE et al., 2008) (Figura 1). Esta espécie caracteriza-se por ser uma planta perene, porém agronomicamente é cultivada como anual. Sua reprodução é normalmente feita através dos estolões, órgãos que, a partir de nós, dão origem a novas plantas, sendo essa a forma de reprodução vegetativa e a mais utilizada comercialmente (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Os frutos, assim popularmente conhecidos, são, na realidade, pseudofrutos, oriundos do crescimento do receptáculo das flores, enquanto o fruto verdadeiro são os aquênios, popularmente conhecidos como sementes (Figura 2) (SANHUEZA et al., 2005).

Figura 1 – Morangueiro (*Fragaria x ananassa*)



Fonte: Timm et al. (2009)

Figura 2 – Pseudofruto de *Fragaria x ananassa*



Fonte: Schwengber e Schiedeck (2008)

O cultivo do morangueiro é mundial, porém os principais produtores são Estados Unidos, Espanha, Coreia, Rússia, Polônia, Japão e Turquia (FAO, 2011). No Brasil, as pesquisas e o cultivo começaram a crescer em importância a partir da década de 1940, quando surgiu o

Instituto Agronômico de Campinas. Porém foi somente nos anos de 1960 que o desenvolvimento dos primeiros cultivares, mais adaptados às condições locais, foram obtidos a partir de cultivares oriundos da Califórnia, nos Estados Unidos da América, aumentando, assim, a produtividade e qualidade dos frutos. Atualmente, os estados com maior produção são Minas Gerais (40%), Rio Grande do Sul (25%) e São Paulo (15%), embora outros, como Santa Catarina e Paraná estejam aumentando sua produção (ANTUNES; PERES, 2013). Hoje, estima-se que a produção anual brasileira esteja na faixa de 105.000 toneladas (ANTUNES; REISSER, 2007).

Embora a produtividade do morangueiro varie de 25 a 50 toneladas/hectare, novos sistemas de cultivo têm sido desenvolvidos visando a aumentar essa produtividade e, principalmente, reduzir os custos de produção (OTTO et al., 2009). Dentre os sistemas de cultivo mais utilizados, podemos dar destaque ao sistema convencional, em que a planta está em contato direto com o solo. Esse sistema tem como principal vantagem a fácil implantação e o baixo custo, embora apresente, como principal desvantagem, a necessidade de rotação de cultura (BORDIGNON JR, 2008).

O sistema em ambiente protegido no solo é o mais empregado no Brasil, que, apesar de conservar a característica desse tipo de cultivo, agrega um sistema de proteção, tendo em vista a prevenção contra intempéries climáticas. Entre as formas de proteção utilizadas, a cobertura plástica é a mais comumente encontrada, com vantagem em relação ao sistema convencional (TEIXEIRA, 2011).

Podemos mencionar, ainda, o sistema de cultivo fora do solo, o qual favorece um controle mais eficaz de fertilização e do desenvolvimento de doenças, permitindo, dessa forma, controlar as condições de cultivo quando comparado aos demais sistemas de produção (BORDIGNON JR, 2008).

3.2.1.1 Cultivares

O desenvolvimento de novos cultivares é outro ponto relevante para o aumento da produtividade de morangos, visto que a adaptação das plantas ao meio é extremamente importante para uma boa produtividade. Conforme anteriormente citado, os cultivares de *F. x ananassa* podem ser classificados em três tipos, com base, principalmente, na sensibilidade ao fotoperíodo. Dessa forma, temos cultivares de dias curtos, neutros e longos, sendo que a maioria dos utilizados atualmente são os de dias curtos e neutros (STRASSBURGER et al., 2010). O fotoperíodo e a temperatura são os principais responsáveis por induzir a floração do

morangueiro, principalmente em cultivares de dias curtos. Por outro lado, nos cultivares de dias neutros, a floração está relacionada, principalmente, com a temperatura, emitindo gemas florais com temperaturas abaixo de 28°C. Já os cultivares de dias longos necessitam de um grande período de exposição à luz, motivo pelo qual são pouco utilizados comercialmente (CALVETE et al., 2008; FRANQUES, 2009).

Embora existam diferentes cultivares utilizados no Brasil, os mais empregados são Oso Grande (50%), Camarosa (30%), Albion (6%) e Aromas (4%) (ANTUNES; PERES, 2013; CALVETE et al., 2008; RADIN et al., 2011). A escolha correta do cultivar é de extrema importância para o sucesso da produção, pois com base nessa escolha serão adotados tratamentos culturais adequados, possibilitando, assim, a obtenção de frutos com maior qualidade (ANTUNES; PERES, 2013). As principais características dos cultivares utilizados neste trabalho estão descritas abaixo.

3.2.1.1.1 *Cultivar Albion*

Albion é uma variedade originária da Califórnia, conhecida por produzir frutos grandes, de consistência firme e de cor vermelha. É um cultivar que possui alto rendimento e é classificado como cultivar de fotoperíodo neutro (SAMYKANNO; PANG; MARRIOTT, 2013).

3.2.1.1.2 *Cultivar Aromas*

É um cultivar de dias neutros, desenvolvido em 1997, pela Universidade da Califórnia. Produz frutos grandes, com coloração vermelho-escuro, com boa aceitação para o consumo *in natura* e para industrialização, especialmente pelo fato de apresentar sabor agradável. Apresenta uma alta produtividade, além de ser considerado resistente às variações climáticas (BORDIGNON JR, 2008).

3.2.1.1.3 *Cultivar Camarosa*

Desenvolvido na Universidade da Califórnia, em 1992, este cultivar é classificado como de dias curtos. Seus frutos apresentam-se grandes, cônicos, uniformes, com coloração vermelho-escuro e polpa firme, sendo, dessa forma, utilizado tanto pela indústria como para o consumo *in natura* (BORDIGNON JR, 2008; PALHA, 2005).

3.2.1.1.4 *Cultivar Camino Real*

Cultivar de fotoperíodo curto, obtido em 2001 pela Universidade da Califórnia. Sua produção é uniforme, porém produz poucos frutos com qualidade inferior, ponto a ser destacado quando comparado aos demais cultivares, porém sua produção é mais lenta. Os frutos possuem forma

cônica e aquênios bem sobressaídos, sobre sua coloração vermelho viva (PALHA, 2005; TEIXEIRA, 2011).

3.2.1.1.5 Cultivar Monte Rey

Monte Rey é um cultivar de dia neutro, lançado pela Universidade da Califórnia, em 2009. Os frutos são grandes, porém apresentam polpa menos firme que os demais. Apresenta sabor com alta aceitação e bom perfil de resistência a doenças (NORCALNURSERY, 2013).

3.2.1.1.6 Cultivar Portola

Portola trata-se de um cultivar de dia neutro. Seus frutos apresentam-se de cor um pouco mais clara e mais brilhante, excelente sabor e seu crescimento vegetativo é vigoroso. Desenvolvido pela Universidade da Califórnia (NORCALNURSERY, 2013).

3.2.1.1.7 Cultivar San Andreas

Desenvolvido pela Universidade da Califórnia, em 2009, San Andreas é um cultivar de dia neutro. Produz frutos de alta qualidade, pois seu sabor e aparência são considerados excelentes (NORCALNURSERY, 2013).

3.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Em relação ao metabolismo secundário de *Fragaria x ananassa*, podemos ressaltar a presença de umas das maiores classes existentes nos vegetais, os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos apresentam-se como uma classe que possui grande diversidade estrutural, compreendendo desde substâncias simples, como ácidos fenólicos, até as mais complexas como as proantocianidinas. Esses compostos são sintetizados pelas plantas, principalmente durante seu desenvolvimento, e, ainda, sob condições de estresse, como em infecções, radiação UV ou ainda na presença de lesões no tecido vegetal.

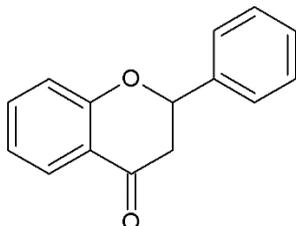
Os compostos fenólicos encontrados em plantas podem ser divididos, de forma geral, em fenólicos simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, lignanas, ligninas e taninos hidrolisáveis e condensados (BRUNETON et al., 2001; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010; NACZK; SHAHIDI, 2004; STALIKAS, 2007; VALLS et al., 2009).

Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides têm uma expressiva presença na natureza. A eles é atribuída a responsabilidade pela proteção contra a radiação ultravioleta, protegendo os tecidos contra os danos

causados, principalmente, pela radiação UV-B (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; ZUANAZZI; MONTANHA, 2010). Os flavonoides estão presentes em uma grande variedade de alimentos, como frutas, hortaliças, sementes e diversas bebidas, como o vinho. Alguns estudos estimam que a ingestão diária de flavonoides esteja na faixa de 1 g por indivíduo ao dia, dos quais aproximadamente 200 mg só de antocianinas (ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

A origem biossintética é comum a todos os flavonoides, sendo derivados da rota do ácido chiquímico e da via do acetato, as quais são responsáveis pela formação de uma estrutura fundamental básica, conhecida como 2-fenilcromano (Figura 3) (BRUNETON et al., 2001; PAL; DUBEY, 2013; STALIKAS, 2007).

Figura 3 – 2-fenilcromano



Devido à diversidade de flavonoides existentes, algumas subclasses foram criadas com a finalidade de agrupar os compostos mais semelhantes, entre as quais podemos citar a classe das chalconas, flavonas, flavanonas, flavonóis, flavononois, isoflavonas e antocianinas (BRUNETON et al., 2001; NACZK; SHAHIDI, 2004; ZUANAZZI; MONTANHA, 2010).

3.3.1 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos solúveis em água que têm despertado grande interesse da indústria alimentícia, com o intuito de utilizá-los como substitutos aos corantes sintéticos os quais podem ser altamente tóxicos à saúde humana (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; VALLS et al., 2009). Outro aspecto que confere grande interesse no estudo das antocianinas é a capacidade antioxidante, a qual é responsável pela prevenção de diversas patologias, como câncer e doenças cardíacas, ambas relacionadas ao estresse oxidativo (BUENO et al., 2012; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; VALLS et al., 2009).

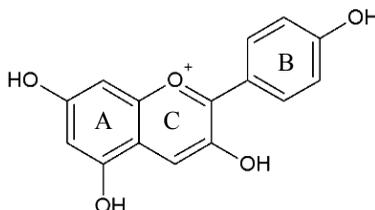
O termo antociano é oriundo do Grego (*anthos* = flor e *kyanos* = azul), utilizado no século 18 para descrever pigmentos azuis encontrados em flores de *Centaurea cyanus*. Posteriormente, Willstatter e Everst identificaram, em 1913, a primeira antocianina (pentahidroxi-2-fenilbenzopirílio) em flores de *Centaurea cyanus* (BRUNETON et al., 2001; BUENO et al., 2012; ZUANAZZI; MONTANHA, 2010).

Os pigmentos antociânicos estão presentes em diversos órgãos vegetais, conferindo coloração azul, vermelha e violeta, principalmente a frutos, flores, folhas ou, ainda, em menores teores em raízes (BRUNETON et al., 2001; DE PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLESTA, 2008; KONCZAK et al., 2005; KONCZAK; ZHANG, 2004). Esses compostos estão normalmente localizados em solução nos vacúolos de células epidermais, porém, em alguns vegetais, estão localizados em organelas especializadas, conhecidas como antocianoplastos (DE PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLESTA, 2008).

3.3.1.1 Características químicas

Antocianinas são compostos fenólicos, presentes no subgrupo dos flavonoides, representados por uma aglicona, chamada de antocianidina, com um ou mais açúcares ligados, possuindo massa molecular de 400 a 1200 g.mol⁻¹. As antocianidinas são derivadas de um núcleo denominado 2-fenilbenzopirílio, o qual é formado por um anel aromático (A) ligado a um anel heterocíclico (C) que, por sua vez, está ligado a um terceiro anel aromático (B) (Figura 4) (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; BUENO et al., 2012; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; HE; GIUSTI, 2010; PEREIRA et al., 2009).

Figura 4 – Estrutura química da pelargonidina



Fonte: Andersen e Markham (2006)

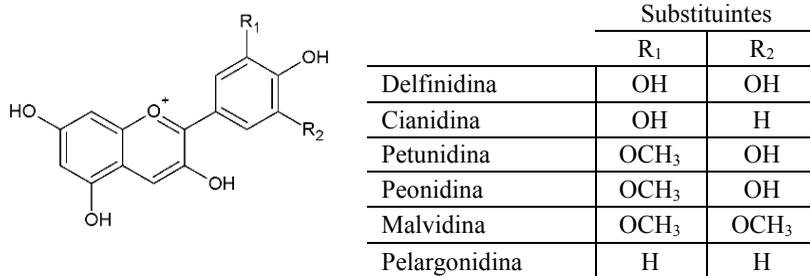
Em consequência da presença de oito ligações duplas conjugadas, as antocianinas são intensamente coradas quando em condições ácidas, apresentando um máximo de absorção na faixa de 490 a 550 nm, região

visível do espectro, embora ainda possam apresentar absorção na região ultravioleta entre 270 e 280 nm (GIUSTI; WROLSTAD, 2001; HE; GIUSTI, 2010).

Antocianidinas raramente estão presentes nos vegetais, em razão da pouca estabilidade, sendo a forma glicosilada a mais encontrada. Devido à estabilidade gerada pela glicosilação, que possibilita a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares, antocianidinas normalmente são encontradas como artefato em extratos (BUENO et al., 2012; HE; GIUSTI, 2010). Existem descritas cerca de 31 antocianidinas monoméricas, e as principais diferenças entre elas são o número e a posição de grupamentos hidroxila ou metoxila encontrados (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; BUENO et al., 2012; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011; DE PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLESTA, 2008).

Apesar da existência de mais de 30 antocianidinas, 90% das antocianinas têm como base a cianidina (30%), a delphinidina (22%) e a pelargonidina (18%), as quais podem ser encontradas, principalmente, em folhas (80%), frutos (69%) e flores (50%). As demais antocianinas são formadas a partir de outras três estruturas, conhecidas como peonidina, malvidina e petunidina (Figura 5) (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; BORKOWSKI et al., 2005; DEL RIO; BORGES; CROZIER, 2010; KONG, 2003).

Figura 5 – Principais antocianidinas



Fonte: Del Rio et al. (2013)

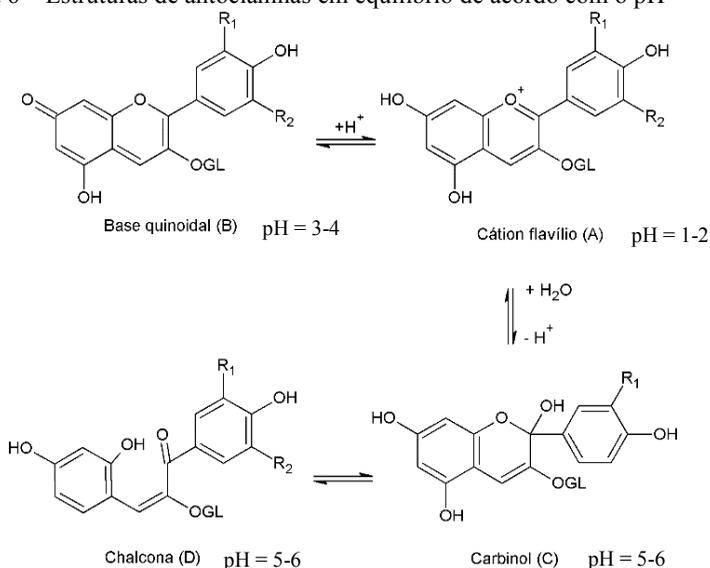
As principais diferenças nas antocianinas estão relacionadas ao número de açúcares ligados, a posição na qual eles estão conectados à aglicona, e, ainda, ao tipo de açúcar ligado. Dentre os açúcares mais comumente descritos estão a glicose, a galactose, a arabinose e a xilose (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

O número de açúcares ligados à aglicona também pode variar, sendo que a grande maioria das antocianinas possui dois, três ou apenas um açúcar ligado, embora já tenha sido descrita a presença de até sete açúcares ligados à aglicona (TERAHARA et al., 1990). A ligação das oses às agliconas normalmente ocorre por ligações *O*-glicosídicas, embora existam casos raros de ligações tipo *C*-glicosídica (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; PEREIRA et al., 2009; SAITO et al., 2003).

Cerca de 65% das antocianinas já relatadas apresentam-se aciladas, na sua maioria, por ácidos aromáticos ou, ainda, por ácidos alifáticos (ANDERSEN; MARKHAM, 2006). Dentre os ácidos aromáticos mais comumente encontrados, podemos citar o ácido cafeico, ferúlico, sinápico, ácidos *p*-cumáricos e 3,5-dihroxicinâmicos, e, ainda, dois ácidos hidroxibenzóicos (*p*-hidroxibenzóico e ácido gálico). Os alifáticos são encontrados de forma mais limitada, sendo os ácidos acético, málico, oxálico, succínico e tartárico os mais descritos (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; BUENO et al., 2012; CORRADINI et al., 2011; HE; GIUSTI, 2010).

As antocianinas são estruturas com características próprias em comparação aos demais flavonoides, pelo fato de se rearranjarem em função de alterações no pH (DEL RIO; BORGES; CROZIER, 2010; HE; GIUSTI, 2010). Podemos encontrar quatro principais formas estruturais em equilíbrio: cátion flavílio, base quinoidal, carbinol pseudobase e chalcona (BROUILLARD; DUBOIS, 1977; BUENO et al., 2012; CLIFFORD, 2000; DE PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLESTA, 2008; DEL RIO; BORGES; CROZIER, 2010). De acordo com o pH da solução e a estrutura da antocianina, é possível encontrar diferentes concentrações de cada forma em equilíbrio (DE PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLESTA, 2008). Em pH ácido (1-2), as antocianinas estarão predominantemente na forma de um cátion flavílio (Figura 6A), sendo esta a forma mais estável, com coloração que vai do vermelho ao roxo. Em pH variando de 3 a 4, a forma de base quinoidal (Figura 6B) é a principal, proporcionando uma coloração azul. Quando o pH está entre 5 e 6, duas formas estruturais são observadas, a carbinol pseudobase (Figura 6C) e uma chalcona (Figura 6D), as quais não apresentam coloração. Em pH acima de 7, ocorrerá a degradação das antocianinas, levando à formação de um ácido fenólico e um aldeído. Quando o pH está entre 4 e 6, podemos ter a presença das quatro formas estruturais presentes simultaneamente (ANTUNES; PERES, 2013; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Figura 6 – Estruturas de antocianinas em equilíbrio de acordo com o pH



Fonte: Adaptado de Giusti e Wrolstad (2001)

3.3.1.2 Estabilidade

As antocianinas, quando isoladas, possuem pouca estabilidade e estão vulneráveis à degradação (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). Muitos são os fatores que afetam essa estabilidade, sendo os principais o pH (AMR; AL-TAMIMI, 2007; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009), a temperatura (AMR; AL-TAMIMI, 2007; RUBINSKIENE et al., 2005), presença de enzimas, exposição à luz (AMR; AL-TAMIMI, 2007), presença de açúcares, além de outros compostos fenólicos e íons metálicos (AMR; AL-TAMIMI, 2007; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011; REIN; HEINONEN, 2004).

As diferenças na estrutura também afetam a estabilidade, influenciada, principalmente, pelos substituintes localizados no anel B, em que a presença de grupamentos hidroxila e metoxila diminuem a estabilidade da molécula em pH neutro. Dessa forma, a pelargonidina é a antocianidina que possui maior estabilidade (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; FLESCHHUT et al., 2006).

A presença de açúcares ligados à aglicona é outro fator que faz com que ocorra um aumento na estabilidade, visto que os diglicosídeos são mais estáveis que os monoglicosídeos. Essa característica ocorre porque

a presença de moléculas de açúcares impede a degradação, a qual resulta na formação de ácidos fenólicos e aldeídos a partir dos intermediários instáveis (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; FLESCHHUT et al., 2006; GARZON; WROLSTAD, 2002).

3.3.1.3 Copigmentação

O principal fenômeno envolvido na estabilidade das antocianinas é conhecido como copigmentação, que consiste em uma associação entre uma molécula orgânica, normalmente incolor, e as antocianinas, gerando um aumento ou alteração na intensidade da cor, e que as torna mais estáveis aos fatores citados anteriormente (BOULTON, 2001; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

A copigmentação, mecanismo de ocorrência natural nos vegetais, ocasiona um efeito batocrômico do espectro de absorção, no qual ocorre um deslocamento do máximo de absorção, normalmente em torno de 5 a 20 nanômetros e, ainda, um efeito hiperacrômico, que consiste em um aumento na intensidade da coloração das antocianinas (BOULTON, 2001; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011).

Esse mecanismo é resultado de um processo espontâneo de diversas interações, que podem ser divididas em copigmentação intramolecular e intermolecular (BOULTON, 2001; BUENO et al., 2012; CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011; ESCRIBANO-BAILON; SANTOS-BUELGA, 2012). O mecanismo de copigmentação intramolecular ocorre quando o grupamento cromóforo se liga covalentemente ao resíduo de açúcar presente na molécula, processo que normalmente se dá em antocianinas aciladas (BUENO et al., 2012; CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011; ESCRIBANO-BAILON; SANTOS-BUELGA, 2012).

Além do processo intramolecular, também é encontrada copigmentação intermolecular, que consiste na ligação de duas moléculas de antocianinas idênticas, ou, ainda, na ligação de uma antocianina com um metal ou diversos outros compostos como ácidos fenólicos e flavonoides (BOULTON, 2001; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). A copigmentação intramolecular é mais eficiente que a intermolecular devido à proteção que o grupamento acila exerce sobre a molécula das antocianinas, impedindo sua hidratação, responsável pelo ataque nucleofílico das moléculas de água (BUENO et al., 2012).

O processo de copigmentação ocorre, principalmente, com a formação do complexo no anel B das antocianinas, mais especificamente quando existe a presença de duas hidroxilas ligadas ao anel em posição

orto, encontradas na cianidina, delfinidina e petunidina (BOULTON, 2001; STARR; FRANCIS, 1973).

Devido ao fato de se apresentarem como compostos glicosilados, as antocianinas possuem a tendência de uma coloração avermelhada, que contribui para a composição da tonalidade final. Enquanto isso, a coloração azulada está associada à presença de ácidos aromáticos acilados, podendo variar a intensidade da cor, dependendo do número de ácidos ligados à molécula (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008).

3.3.1.4 Métodos de extração, identificação e quantificação

As características estruturais, como a presença de açúcares ligados ao núcleo fundamental, conferem às antocianinas caráter polar, o que torna os solventes polares os mais utilizados para a extração. Usualmente essas substâncias são extraídas com etanol, metanol e acetona, ou suas misturas aquosas (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; KAJDZANOSKA; PETRESKA; STEFOVA, 2011; KONG, 2003). Com o intuito de tornar mais eficiente a extração desses compostos, a adição de ácidos em baixa concentração normalmente é uma opção, visando a obter uma solução extrativa com pH na faixa de 1 a 2. Para isso, os ácidos clorídrico e fórmico são os mais comumente utilizados (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; KAJDZANOSKA; PETRESKA; STEFOVA, 2011; KONG, 2003).

Soluções extrativas com pH ácido tornam-se mais eficientes devido a sua capacidade de destruir as membranas celulares, facilitando, assim, a extração dos compostos do interior das células. Além da eficiência de extração, outra vantagem da utilização de sistemas ácidos consiste na estabilização dos compostos antociânicos. Apesar das vantagens citadas, concentrações elevadas de ácido podem ocasionar a hidrólise do heterosídeo, o que pode gerar um artefato de extração com a liberação da aglicona (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; DA COSTA; HORTON; MARGOLIS, 2000; NACZK; SHAHIDI, 2004).

Os métodos extrativos, normalmente em frutos, utilizam, em geral, a liofilização, ou a imersão direta dos frutos frescos na solução extrativa (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). Com o intuito de auxiliar a extração de forma a torná-la mais eficiente, técnicas com ondas de ultrassom são as mais utilizadas, em virtude da impossibilidade de processos que envolvam aquecimento. Embora os sistemas de banho de ultrassom sejam os mais empregados, o uso de sonda de ultrassom venha sendo uma alternativa recente para aumentar ainda mais a eficiência do processo (ZOU et al., 2012).

Com o intuito de identificar e quantificar os compostos presentes, seja em frutos, como no presente trabalho, ou nos diversos objetos de

interesse, diferentes técnicas podem ser empregadas, sejam elas visando à identificação ou apenas à quantificação dos compostos em foco. O conhecimento da composição química, bem como de seus teores, pode ser de extrema importância para identificação taxonômica de diversas espécies, e para percepção de possíveis adulterações em alimentos processados (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), em fase reversa, é a técnica mais comumente usada para separação e identificação de antocianinas, devido a sua rapidez, sensibilidade e possibilidade de quantificação (BUENO et al., 2012). A detecção mais utilizada é feita com auxílio de um detector por arranjos de diodos (DAD), o qual possibilita a quantificação, além de fornecer o espectro UV-Vis dos compostos, viabilizando informações sobre as características estruturais de cada substância (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; DA COSTA; HORTON; MARGOLIS, 2000; VALLS et al., 2009).

Apesar dos detectores por arranjos de diodos serem os mais utilizados, muitas vezes esses não são eficientes na identificação estrutural de compostos. Muitos compostos, por apresentarem estruturas químicas muito semelhantes, dificultam a separação dos mesmos no processo cromatográfico, sendo assim a quantificação e identificação através de detector DAD torna-se ineficiente. Como alternativa, podem ser utilizados detectores mais eficientes, como os detectores baseados na espectrometria de massas, que possibilitam a detecção e quantificação mesmo sem a necessidade de um processo cromatográfico com grande eficiência. Essa técnica permite a identificação individual de compostos presentes em uma matriz complexa (DA COSTA; HORTON; MARGOLIS, 2000; VALLS et al., 2009).

As formas de eluição utilizadas em metodologias por CLAE baseiam-se em métodos isocráticos ou gradientes lineares. Contudo, devido à complexidade de extratos vegetais e/ou similaridade dos compostos, na maioria dos trabalhos faz-se necessário o uso de gradientes como principais alternativas para a obtenção de sucesso no processo cromatográfico. Dentre os solventes orgânicos, podemos destacar a acetonitrila e o metanol como os mais comumente utilizados (DA COSTA; HORTON; MARGOLIS, 2000; VALLS et al., 2009). Especialmente em análises de compostos antocianínicos, existe a necessidade de utilização de fase móvel com concentração ácida mais elevada, visando a deslocar o equilíbrio químico das estruturas para apenas uma forma estrutural, no caso o cátion flavílio (DA COSTA; HORTON; MARGOLIS, 2000).

Considerando apenas a quantificação de antocianinas, podemos destacar, ainda, a utilização de espectrofotometria na região visível,

conhecida como método do pH diferencial. Esse método é baseado na diferença estrutural das antocianinas em diferentes faixas de pH. A técnica consiste na quantificação de antocianinas monoméricas totais, devido à propriedade que possuem de transformação reversível de sua estrutura, pois, quando em pH 1, estão na forma de cátion flavílio, mas, quando em pH 4,5, estão na forma de um hemiacetal incolor. Com base nessas características, é possível determinar a concentração a partir da diferença de absorvância, utilizando o comprimento de onda de absorção máxima da molécula (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005; WROLSTAD; DURST; LEE, 2005). O método espectrofotométrico descrito por Lee, Durst e Wrolstad (2005) é simples, rápido, econômico e preciso para a quantificação de antocianinas monoméricas totais (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005; LEE; RENNAKER; WROLSTAD, 2008).

Apesar da técnica de CLAE ser a mais amplamente utilizada, nas últimas décadas a eletroforese capilar (EC) tem se tornado uma ferramenta atrativa, por se tratar de uma técnica de separação, identificação e quantificação. A sua alta eficiência de separação, rapidez nas análises, necessidade de baixo volume de amostra, baixo consumo de solvente são algumas das principais vantagens quando comparada à CLAE, porém a sensibilidade é inferior, e seu uso é pouco difundido (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; DA COSTA; HORTON; MARGOLIS, 2000).

As primeiras descrições de uso de EC para a análise de antocianinas datam do ano de 1996, por Bridle, Garcia-Viguera e Tomas-Barberan (1996), os quais, utilizando capilar de sílica fundida e borato de sódio como eletrólito de análise (pH 8), demonstram a viabilidade da utilização da técnica, separando uma mistura de padrões com a injeção de apenas 9 nL de amostra. Em um estudo seguinte, Bridle e Garcia-Viguera (1997) descreveram a separação de antocianinas em extratos de frutos de morango e *Sambucus nigra*.

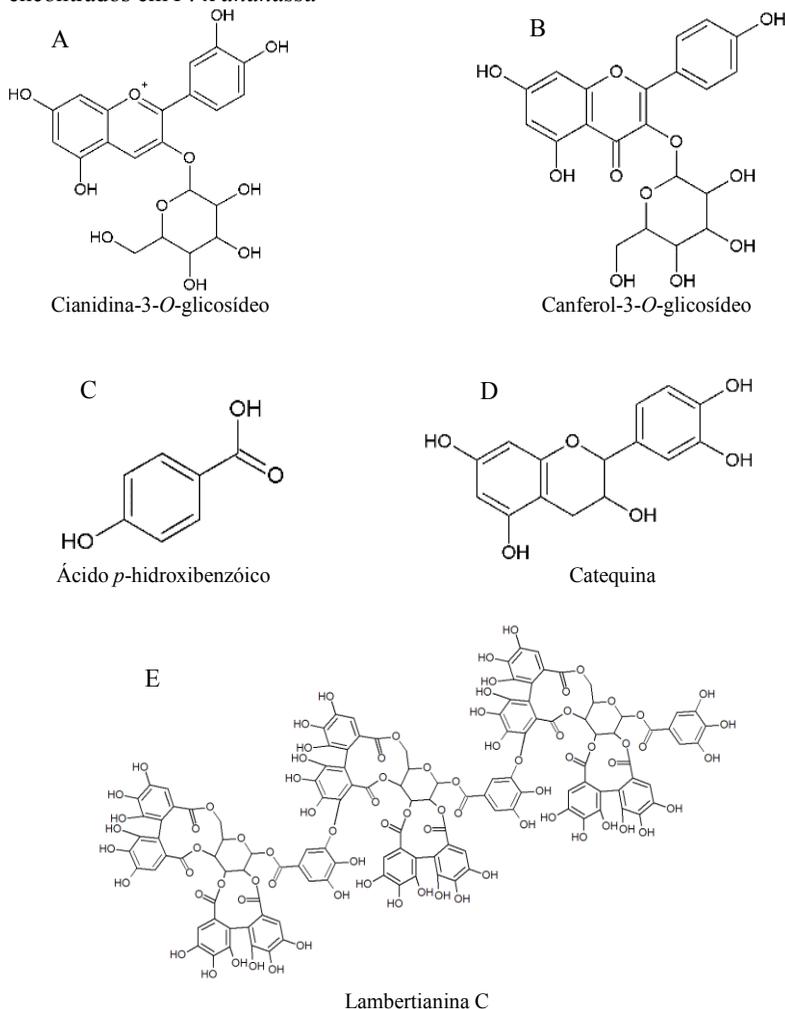
Devido à instabilidade das antocianinas em pH alcalino, Da Costa et al. (1998) desenvolveram metodologia utilizando, como eletrólito de análise, fosfato de sódio com pH ajustado em 1,5. Estes ajustes na metodologia permitiram o aumento da estabilidade dos compostos e um acréscimo na sensibilidade da metodologia, diminuindo cerca de 160 vezes o limite de detecção.

3.3.2 Metabólitos secundários em *Fragaria x ananassa* Duch.

Os metabólitos secundários presentes em *F. x ananassa* são representados, na sua grande maioria, por compostos fenólicos, majoritariamente por flavonoides, em que os principais representantes são

as antocianinas (Figura 7A) e flavonóis (Figura 7B). Ainda são encontrados, em grandes concentrações, nos frutos de morango, taninos hidrolisáveis, principalmente elagitaninos (Figura 7E), ácidos fenólicos (Figura 7C), flavanóis (Figura 7D) e, em teores menos elevados, as proantocianidinas (AABY et al., 2012; GIAMPIERI et al., 2013; GIAMPIERI et al., 2012).

Figura 7 – Exemplos das principais classes de metabólitos secundários encontrados em *F. x ananassa*



O grande número de pesquisas com o intuito de estudar a presença de compostos antociânicos em frutos de morango, pode ser demonstrado pelo expressivo resultado encontrado a partir em pesquisa com os termos “*Fragaria x ananassa* e antocianina” realizada no banco de dados Scopus, com os quais foram obtidos 459 resultados. Dessa forma, podemos demonstrar a importância dos compostos antociânicos nos frutos de morango, bem como a grande variação de concentração presente.

As antocianinas constituem o grupo de metabólitos com maior destaque nos frutos de morango, devido à coloração característica por ela apresentada. Entre as antocianinas presentes nesses frutos, a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo representa mais de 80% do total de antocianinas encontradas, seguida pela cianidina-3-*O*-glicosídeo e pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo, sendo que estas três estruturas compreendem mais de 95% da totalidade das antocianinas (BRIDLE; GARCIA-VIGUERA, 1997; DA SILVA et al., 2007; GIAMPIERI et al., 2013; LUKTON; CHICHESTER; MACKINNEY, 1955; WICKLUND et al., 2005). Além dessas, existem descritas mais 22 antocianinas para frutos de *F. x ananassa*, dentre as quais a maioria apresenta pelargonidina como aglicona, enquanto as demais são derivadas de cianidina (DA SILVA et al., 2007).

Os teores de antocianinas totais presentes nos frutos de morango, apresentam grandes variações de acordo com os dados disponíveis na literatura. Segundo Clifford (2000), estes teores podem variar de 15 a 35 mg.100 g⁻¹ de fruto fresco, sendo que essa variação está fortemente associada a fatores edafoclimáticos, sazonalidade, grau de maturação além do tipo de cultivar (DA SILVA et al., 2007; MEYERS et al., 2003). Já Buendia et al. (2010), avaliando a composição química de compostos fenólicos em 15 cultivares, demonstraram que o teor de antocianinas totais esteve entre 20,2 e 47,4 mg.100 g⁻¹ de fruto fresco, apresentando uma pequena variação na faixa de concentração em relação a Clifford.

Muitos outros estudos descrevem variações mais amplas nos teores de antocianinas em frutos de morango, como o realizado por Aaby et al. (2012), em que foram detectados valores de 11,3 a 65,9 mg.100 g⁻¹ de fruto fresco para as cultivares Carisma e Rondo, respectivamente. Já Lal et al. (2013), trabalhando com 22 cultivares, encontraram uma menor variação, entre 28,24 - 43,32 mg.100 g⁻¹ de fruto fresco para as cultivares Douglas e Brighton, respectivamente.

Visando a demonstrar a influência edafoclimática na composição química de frutos de morango, Josuttis et al. (2013) realizaram estudo comparando a variação nos teores de antocianinas totais em um mesmo

cultivar oriundo de diferentes países. Com seus resultados, foi possível observar que a variação nos teores no mesmo cultivar, apenas pela alteração do local de cultivo, situou-se entre 26,6 e 34,5 mg.100 g⁻¹ de fruto fresco, demonstrando a influência não apenas dos fatores genéticos, mas também dos ambientais na biossíntese de antocianinas.

A presença de outros compostos fenólicos é descrita por diversos autores, dentre os quais podemos citar o estudo efetuado por Kosar (2004), que analisou os compostos fenólicos por CLAE/DAD, presentes em quatro cultivares de frutos de morango após a extração durante 1 h sob refluxo com acetona e ácido trifluoracético. Foram identificados oito compostos, sendo eles antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos.

Diferentes cultivares de morangueiro foram avaliados por CLAE-DAD visando à identificação e quantificação dos compostos fenólicos nos frutos dessa espécie. Os resultados descritos por Hernanz et al. (2007) demonstraram a existência de variação nos teores de compostos fenólicos totais entre 17,9 a 29,9 mg.100 g⁻¹ de fruto fresco. Kelebek e Selli (2011) também descreveram a presença de compostos fenólicos em extratos de diferentes cultivares de *F. x ananassa*, sendo identificados 18 compostos, com teores totais variando entre 36,96 a 73,87 mg.100 g⁻¹ de fruto fresco.

Devido ao grande número de estudos visando à identificação dos compostos fenólicos em frutos de morango, o Quadro 1 apresenta os principais compostos já descritos.

Quadro 1 – Principais compostos fenólicos descritos na literatura em frutos de morango

Autores	Flavonóis	Flavanóis	Elagitaninos	Ácidos hidroxibenzóicos	Ácidos cinâmicos	Proantocianidinas
Aaby, Ekeberg e Skrede (2007)		Catequina	Galoil-HHDP glicosídeo	Hidroxibenzoil hexose		Proantocianidina B1 Proantocianidina B3 Trímero
Wojdylo, Oszmianski e Bober (2008)	Quercetina-3-glicosídeo	Catequina		Glicosídeo do ácido elágico	Ácido <i>p</i> -cumaril glicosídeo	Proantocianidina B3
Wang e Milliner (2009)	Quercetina-3-glicosídeo Quercetina-3-glicuronídeo Canferol-3-glicosídeo Canferol-3-glicuronídeo			Glicosídeo do ácido elágico	Ácido <i>p</i> -cumaril glicosídeo	
Li et al. (2009)				Ácido gálico Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	Ácido <i>trans</i> -cinâmico Ácido cumárico	
Simirgiotis et al. (2009)	Quercetina glicuronídeo Metil-quercetina glicuronídeo Canferol-cumaril hexosídeo		Derivados de elagitaninos	Ácido elágico pentosídeo Ácido elágico ramnosídeo	Ácido <i>p</i> -cumaril glicosídeo	Tetrâmeros
Buendia et al.(2010)	Quercetina glicuronídeo Canferol-3-glicosídeo Canferol- <i>p</i> -cumaril glicosídeo		Galoil-bis-HHDP glicosídeo Sanguina-H6 Lambertianina C		Éster do ácido <i>p</i> -cumárico Derivado do ácido ferúlico	

Conclusão quadro 1 – Principais compostos fenólicos descritos na literatura em frutos de morango

Jin et al.(2011)	Quercetina-3-glicosídeo Canferol-3-glicosídeo			Ácido elágico glicosídeo	Glicosídeo <i>p</i> -cumaril	
Kajdzanoska, Petreska e Stefova (2011)	Quercetina-3-glicuronídeo Canferol-3-cumarilglicosídeo Canferol-3-acetilglicosídeo	Catequina			Cafeoil hexose <i>p</i> -cumaril hexose Ácido fértilico hexose	Dímeros Trímeros Tetrâmeros
Kelebek e Selli (2011)	Quercetina-3-glicuronídeo Quercetina-3-pentosídeo Canferol-3-glicosídeo Canferol-cumaril hexosídeo	Catequina	Galoil-bis-HHDP glicosídeo Sanguina-H6 Lambertianina C	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	Ácido <i>p</i> -cumárico Derivados do ácido fértilico Ácido cafeico	
Huang et al. (2012)	Quercetina-3-ramnosídeo	Galhocatequina Epigalhocatequina Catequina Catequina galato		Ácido gálico Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico Ácido. elágico	Ácido cafeico Ácido cinâmico	
Josuttis et al. (2013)			Galoil-HHDP glicosídeo Sanguina-H6 Lambertianina C Agrimonina Castalagina			Dímeros Trímeros Tetrâmeros

3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICA

Muitos são os trabalhos que sugerem diferentes atividades biológicas aos morangos e, especialmente, para as antocianinas, dentre as quais podemos citar a prevenção a processos inflamatórios, estresse oxidativo, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, diabetes tipo 2, obesidade e doenças neurodegenerativas (GIAMPIERI et al., 2013).

3.4.1 Estresse oxidativo

Os processos de prevenção ao estresse oxidativo, representados principalmente pelo potencial antioxidante, apresentam grande relevância no estudo dos frutos vermelhos. A capacidade antioxidante, a qual está intimamente relacionada com a presença de compostos fenólicos, e que vem sendo exaustivamente estudada nas últimas décadas em frutos vermelhos, tem sido considerada como responsável por indicar possíveis efeitos benéficos atribuídos a esses alimentos (GALVANO et al., 2004; GIAMPIERI et al., 2013).

Alvarez-Suarez et al. (2011) demonstraram que ratos que receberam 1 mL de etanol e extrato bruto de frutos de morango diariamente durante 10 dias, aumentaram a atividade da enzima catalase, mas a superóxido dismutase não sofreu alteração. A redução dos teores de malondialdeído também foi observada em comparação ao grupo que foi exposto unicamente ao etanol, demonstrando a ação dos extratos na redução do processo de estresse oxidativo. Porém não apenas o potencial antioxidante foi avaliado, a proteção contra os danos causados pelo etanol à mucosa gástrica também foi analisada. Os resultados demonstraram a redução dos danos à mucosa do estômago em animais que receberam, além de etanol, o extrato dos frutos.

Em estudo realizado por Käkönen, Hopia e Heinonen (2001), com diversos tipos de frutos vermelhos, incluindo frutos de morango, a capacidade antioxidante foi aferida através da técnica de oxidação do linoleato de metila. Os resultados apresentados demonstram existir uma forte correlação entre o teor de flavonoides totais e a capacidade antioxidante apresentada.

Wang, Zheng e Galletta (2002) determinaram, através do ensaio ORAC (capacidade de absorção dos radicais oxigenados), que a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo contribui com 27% do total da capacidade de captação dos radicais livres atribuída ao extrato.

Zhang et al. (2008) demonstraram a capacidade de captação de radicais livres de antocianinas isoladas de extratos de frutos de morango, através da utilização do radical ABTS. Os resultados, expressos em equivalentes de trolox, corroboram com o descrito por Rice-Evans, Miller

e Paganga (1996), quando concluem que a cianidia-3-*O*-glicosídeo é a antocianina com maior potencial antioxidante nos extratos de morango.

3.4.1.1 DPPH

Estudo realizado por Li et al. (2009) teve como objetivo comparar a composição fenólica e a capacidade de sequestrar radicais livres através do ensaio com DPPH. Como amostras para esse trabalho, foram utilizados seis frutos vermelhos, sendo um deles morango. O resultado dessa comparação demonstrou que extratos de frutos de morango apresentam capacidade de sequestrar 40,33% do radical disponível, o que o caracteriza como um fruto com condição mediana de captação dos radicais em comparação aos frutos de framboesa, mirtilo, espinheiro amarelo e chokeberry.

A caracterização química e a potencial capacidade antioxidante foram os objetivos do estudo realizado por Kelebek e Selli (2011), os quais utilizaram o ensaio com o radical DPPH para avaliar a capacidade de sequestrar radicais livres dos extratos de morango de diferentes cultivares. Os resultados indicaram valores de EC_{50} variando de 0,21 a 0,14 mg.mg⁻¹ de DPPH. Em trabalho semelhante, recentemente, Lal et al. (2013) determinaram os teores de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e flavonoides totais em frutos de cultivares de morango e suas correlações com a capacidade antirradicalar do radical DPPH. Os resultados demonstraram a existência de forte correlação entre os teores de fenólicos totais e a capacidade de sequestrar os radicais DPPH ($r^2 = 0,9834$). A correlação com os compostos antociânicos apresentou-se mais fraca ($r^2 = 0,5899$) e, com os teores de flavonoides, não foi encontrada correlação.

3.4.2 Câncer

A relação existente entre a prevenção de proliferação de linhagens celulares tumorais e frutos de morango é descrita, principalmente, através de ensaios *in vitro*, focados nas atividades citotóxicas frente a linhagens celulares tumorais e em modelos animais, visando à diminuição de processos que induzem a tumores (GIAMPIERI et al., 2012).

3.4.2.1 Atividade citotóxica

Segundo Meyers et al. (2003), extratos de morango são capazes de inibir de forma dose-dependente a proliferação de células de hepatocarcinoma humano (HepG₂). O ensaio foi realizado através da técnica colorimétrica com sal de tetrazólio (MTS), porém não foi observada uma correlação positiva com os teores de fenólicos totais.

Outro estudo realizado por Seeram et al. (2006) demonstrou a existência de atividade antiproliferativa tipo dose-dependente em extratos de morango frente a linhagens celulares tumorais de boca (KB), de adenocarcinoma de mama (MCF-7), células CAL 27 (carcinoma de células escamosas orais), células de câncer de próstata (LNCaP) e células de câncer de colón retal (HT-29 e HCT116). No ano de 2008, Zhang, testando a citotoxicidade de extratos de frutos de morango, encontrou resultados semelhantes aos de Seeram, frente às mesmas linhagens celulares tumorais e utilizando a mesma técnica.

3.4.2.2 Ensaios *in vivo*

Ensaios *in vivo*, utilizando frutos de *F. x ananassa* são muito restritos na literatura, porém, dentre alguns existentes, podemos citar o estudo realizado por Stoner et al. (1999), em que os autores descrevem a atividade antitumoral exercida por frutos liofilizados de morango frente à formação de tumores esofágicos induzidos por NMBA (*N*-nitrosometilbenzilamina) em ratos. Para a realização do ensaio, os animais foram tratados durante 24 semanas com a adição de frutos de morango liofilizados e NMBA à dieta. Após a análise do material, foi possível concluir que a incidência do tumor não foi evitada, porém a multiplicação do tumor foi reduzida de forma dose-dependente relação ao extrato. Carlton et al. (2001), em estudo semelhante ao de Stoner, observaram, através de um ensaio com animais tratados com frutos de morango liofilizados e NMBA, a redução dos tumores esofágicos, porém os resultados não apresentaram relação entre dose e atividade.

A formação endógena de compostos *N*-nitrosos é relatada como responsável pela indução de diversos tipos de câncer em roedores (MAGEE, 1956 apud CHUG; LEE; SUNG, 2002). Fundamentados nessa premissa, Chung, Lee e Sung (2002) realizaram ensaio com 40 voluntários sadios, durante 4 dias, visando a determinar o percentual de inibição da formação de compostos nitrosos. O experimento foi realizado utilizando, como dieta, precursores à base de nitrato e amina, com o intuito de induzir a formação de NDMA. Com o objetivo de impedir a nitrosação, extratos de morango foram adicionados à dieta do grupo teste. Os resultados demonstraram uma redução de 70% na formação de NDMA (*N*-nitrosodimetilamina), composto nitroso responsável pela iniciação do processo tumoral, demonstrando a capacidade de proteção exercida pelo extrato dos frutos.

3.4.3 Síndrome metabólica

As doenças cardiovasculares, quando associadas a diabetes, obesidade visceral, intolerância à glicose, hipertensão arterial sistêmica, hipertrigliceridemia, níveis baixos de HDL (lipoproteína de alta densidade) além da resistência à insulina, compõem o quadro conhecido como síndrome metabólica (BALKAU et al., 2007; ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005).

Estudo realizado por Basu et al. (2010) visou a determinar os efeitos dos frutos de morango na atividade antidislipidêmica. Mulheres que apresentavam como característica em comum pelo menos três doenças relacionadas à síndrome metabólica foram selecionadas para o ensaio. Após receberem uma dieta diária contendo 50 g de morango liofilizado, durante 4 semanas, foi observada uma redução no colesterol total e na lipoproteína de baixa densidade.

Dentre os fatores de risco envolvidos tanto na síndrome metabólica, como nas doenças cardiovasculares, as quais compõem a síndrome, podemos citar a hiperlipidemia, destacando a oxidação do LDL. Sendo assim, Burton-Freeman et al. (2010) realizaram ensaio em humanos visando a testar a capacidade dos compostos fenólicos de morango em atenuar os efeitos pós-prandiais após uma refeição rica em gorduras, além de determinar os efeitos no metabolismo lipídico. Os voluntários foram pessoas hiperlipêmicas, e se submeteram a um ensaio duplo-cego randomizado durante 6 semanas. Os indivíduos foram alimentados com uma bebida contendo frutos de morango liofilizados, e os resultados avaliados a partir de quantificação dos teores de colesterol total, LDL, HDL, triglicérides e LDL oxidado. Foi possível concluir que os frutos de morango possuem capacidade de reduzir os riscos de doenças cardiovasculares, principalmente através da redução dos componentes responsáveis pela aterosclerose.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL VEGETAL

Frutos de sete cultivares de *Fragaria x ananassa* foram cultivados, em ambiente protegido com cobertura plástica anti-UV, na Universidade de Passo Fundo, no município de Passo Fundo/RS, sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Eunice Calvete. Os cultivares investigados foram de dias neutros, sendo eles Aromas, Albion, Monte Rey, Portola e San Andreas, além de dois de dias curtos, Camino Real e Camarosa. Os vegetais foram cultivados em ambiente protegido, no solo, e coletados no mês de janeiro de 2012, quando atingiram o seu estado de maturação máximo. Após coleta, foram armazenados a -20°C para posterior extração.

4.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO

Os frutos obtidos, com massa total de 1 kg por cultivar, foram triturados em liquidificador e submetidos à extração em banho de ultrassom. Para preparação dos extratos, foi utilizado apenas o cultivar Monte Rey, submetido a diferentes condições extrativas com o intuito de se obter maiores teores de antocianinas, as quais foram analisadas por meio da técnica de CLAE.

Primeiramente, foram realizadas extrações com etanol, etanol 70%, metanol, metanol 70% e metanol acidificado (HCl) nas concentrações de 0,05%, 0,5%, 1% e 2%, visando a obter os maiores teores de antocianinas sem uma possível hidrólise dos compostos. Outro aspecto analisado foi a relação massa de fruto e quantidade de líquido extrator. Nessa etapa, foram testados proporções de 1 g de frutos para 10, 25 e 50 mL de líquido extrator. O tempo de extração também foi uma variável estudada, sendo os frutos expostos ao banho de ultrassom durante o período de 25, 50 e 75 minutos, sempre ao abrigo da luz. Após a extração, os extratos obtidos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório, com temperatura máxima de 35°C , até a proporção de 1 g para 5 mL de solução. Finalmente, o extrato foi armazenado a -20°C até o momento da realização das análises. Todos os processos foram realizados em triplicata.

4.3 ANÁLISE DOS TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS (TFT)

Para a determinação do teor de fenólicos totais, foram utilizadas duas técnicas espectrofotométricas já descritas na literatura: Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999) e Fast Blue BB (MEDINA, 2011b;a).

4.3.1 Folin-Ciocalteu

O TFT nos extratos de *F. x ananassa* foi realizado a partir da adição de 0,125 mL de cada extrato a 0,5 mL de água destilada e 0,125 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após seis minutos, foram adicionados 1,25 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7%, além de 1 mL de água destilada. Depois da reação de complexação por 90 minutos, as absorvâncias foram medidas a 760 nm em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®. O mesmo procedimento descrito acima foi utilizado para construir a curva analítica, elaborada a partir de soluções metanólicas de ácido gálico na faixa de 60 – 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de fruto fresco (mg EAG.g⁻¹ FF).

4.3.2 Fast Blue BB

O TFT também foi analisado pela metodologia descrita por Medina (2011a), que consiste na reação direta entre o sal de diazônio Fast Blue BB e os compostos polifenólicos. Para tal, foi adicionado, para cada 1 mL de extrato, 0,1 mL do reagente Fast Blue BB em uma concentração de 0,1%. As soluções foram homogeneizadas por 1 minuto para posterior adição de alíquotas de 0,1 mL de NaOH 5%. A reação ocorreu à temperatura ambiente por 90 minutos, e as absorvâncias foram medidas a 420 nm em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®. O mesmo procedimento descrito acima foi utilizado para preparar uma curva analítica contendo seis soluções metanólicas de ácido gálico na faixa de 40 – 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As análises foram efetuadas em triplicata, e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de fruto fresco (mgEAG.g⁻¹ FF).

4.4 ANÁLISE DOS TEORES DE ANTOCIANINAS TOTAIS

Assim como na quantificação dos compostos fenólicos, os teores de antocianinas totais foram mensurados a partir de duas técnicas: o método do pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001) e análise por CLAE.

4.4.1 Método pH diferencial

O doseamento de antocianinas monoméricas totais foi realizado a partir da utilização de duas soluções tampão, das quais a primeira trata-se de uma solução de cloreto de potássio (0,025 M) em pH 1, e a segunda, uma solução de acetato de sódio (0,4 M) com pH 4,5. 5,0 mL de cada tampão foram adicionados a 0,5 mL das diferentes amostras. Após 30

minutos da adição dos tampões, a leitura foi realizada em dois comprimentos de onda (520 e 700 nm). Os resultados foram expressos em miligramas de antocianinas monoméricas totais (AMT) por 100 gramas de fruto fresco, baseado nas equações 1 e 2 descritas por Giusti e Wrolstad (2001) e exemplificadas a seguir.

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{AMT (mg EP.100g FF}^{-1}\text{)} = \frac{A \times \text{MM} \times \text{FD} \times 100}{\epsilon \times L} \quad \text{Equação 2}$$

Nessas equações, MM é massa molecular do padrão utilizado para expressar os resultados; FD é o fator de diluição envolvido na análise; ϵ é o coeficiente de absorvidade molar ($\text{L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$); L trata-se do caminho ótico (cm); EP significa equivalentes de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo, padrão utilizado, e FF corresponde à abreviação de frutos frescos.

O peso molecular utilizado para o cálculo dos teores de AMT foi 433,2 unidades de massa atômica, referente à pelargonidina-3-*O*-glicosídeo, antocianina presente majoritariamente nos frutos de morango.

O fator de diluição refere-se à união de dois fatores. O primeiro relativo à concentração do extrato, para a qual foi utilizado fator 5, resultante da razão entre o volume de solução extrativa e a massa de fruto utilizado. O segundo fator envolvido refere-se à diluição da amostra pela solução tampão. Dessa forma, a razão do volume total (5,5 mL) pelo volume de amostra (0,5 mL) resultou em um FD 11.

O coeficiente de absorvidade molar foi calculado através da equação de Lambert-Beer, e se obteve, como resultado, 25660 $\text{L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para pelargonidina-3-*O*-glicosídeo em uma solução de metanol a 1% HCl.

4.4.2 CLAE

As antocianinas também foram quantificadas e identificadas individualmente pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido da marca PerkinElmer® série 200, equipado com detector de UV por arranjo de diodos, bomba quaternária, degaseificador *on line* e amostrador automático. Os dados foram processados através do software Chromera® Workstation. Todas as análises foram realizadas em coluna Brownlee Choice C18 (150 x 4,6 mm i.d.; 5 μm) PerkinElmer® sob fluxo constante de 1 mL.min^{-1} . O sistema de eluição utilizado baseou-se em um gradiente linear, em que a fase móvel utilizada foi metanol (A) e uma solução aquosa de ácido fórmico 3% (B). A eluição iniciou de forma isocrática,

com a proporção de 10% de A em relação a B durante 2 minutos. Após esse período, ocorreu um aumento linear na proporção de A, chegando a 20% em 1 minuto. Durante os 16 minutos seguintes, a proporção de metanol foi elevada a 41%, para, posteriormente, sofrer um acréscimo final, elevando-se para 70% em 11 minutos. As análises ocorreram sob temperatura de 21°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), com volume de injeção de 20 μL . A fase móvel foi preparada diariamente, passando por processo de filtragem e desgaseificação para posterior utilização. Os cromatogramas foram monitorados no comprimento de onda de 520 nm, e seus respectivos espectros adquiridos na faixa de 190 a 700 nm. Os picos majoritários foram caracterizados através de comparação dos tempos de retenção com as substâncias de referência disponíveis, comparação dos espectros e co-injeção com padrões. As amostras utilizadas foram extratos de frutos de morango em uma concentração de 0,2 gramas de fruto fresco por mililitro da solução extrativa. As substâncias de referência utilizadas foram pelargonidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo.

4.4.2.1 Validação dos parâmetros analíticos

Os parâmetros utilizados para essa validação foram faixa de linearidade, exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção e quantificação (AOAC 2002; ICH - GUIDELINE, 2005). Já os resultados obtidos foram avaliados segundo as diretrizes estabelecidas por AOAC (2002). A metodologia foi validada para os padrões pelargonidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo.

4.4.2.1.1 Faixa de linearidade

A faixa de linearidade compreende o intervalo no qual é possível obter resultados adequados para o componente da amostra e proporcionais à concentração do analito, levando em consideração a precisão e a exatidão da metodologia.

Uma curva analítica foi construída para cada substância de referência, em triplicata, utilizando 8 pontos compreendidos na faixa de 0,625 – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dissolvidos em uma solução metanólica acidificada com ácido clorídrico 1% (v/v).

4.4.2.1.2 Exatidão

A exatidão foi avaliada através de ensaio de recuperação, que consiste na adição da substância de referência ao extrato. Para isso, amostras foram contaminadas com pelargonidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo em três concentrações, levando em consideração a curva analítica, um ponto inferior, um intermediário e um

ponto superior de cada substância. Os padrões, as amostras sem a adição dos padrões e as amostras contaminadas foram analisadas em triplicata. Visando a obter um percentual de recuperação, a equação 3 foi utilizada para calcular os resultados, expressos em percentual de recuperação.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{A_{AM+PAD} - A_{AM}}{A_{PAD}} \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

Na equação citada, A_{AM+PAD} corresponde à área do pico da amostra com o padrão adicionado; A_{AM} é a área da amostra não contaminada com o padrão, e A_{PAD} corresponde à área do pico do padrão.

4.4.2.1.3 Precisão

A precisão foi determinada através de dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi obtida através da injeção de três concentrações dos dois padrões, uma concentração do extremo inferior, uma do extremo superior e uma intermediária da curva analítica, todas feitas em triplicata e no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada da mesma forma que a repetibilidade, porém as injeções foram realizadas em três dias diferentes. Os dois níveis avaliados demonstram seus resultados através do coeficiente de variação (CV) em porcentagem.

4.4.2.1.4 Especificidade

A especificidade foi avaliada utilizando-se a co-injeção com as substâncias de referência disponíveis, e através da pureza do pico determinada pelo espectro fornecido pelo detector por arranjos de diodos.

4.4.2.1.5 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados com base no coeficiente angular e no desvio padrão (S) do coeficiente linear da curva analítica. Para o cálculo dos LD e LQ, as equações 4 e 5 foram utilizadas.

$$LD = 3,3 \frac{S \text{ coeficiente linear}}{\text{coeficiente angular}} \quad \text{Equação 4}$$

$$LQ = 10 \frac{S \text{ coeficiente linear}}{\text{coeficiente angular}} \quad \text{Equação 5}$$

4.5 CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES (DPPH)

A determinação da capacidade de captação de radicais livres foi realizada com base no método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e modificado por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998), conhecido como método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). A determinação foi realizada pela adição de 100 μL de quatro diferentes concentrações de cada amostra a 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH (60 μM). Após 60 minutos, as absorbâncias das amostras foram medidas em comprimento de onda de 515 nm em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer[®]. As análises foram efetuadas em triplicata, e os resultados, plotados em absorbância *versus* a concentração da amostra, com objetivo de obter os valores de EC_{50} , a qual é definida como a concentração necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH, sendo os resultados expressos em mg mL^{-1} .

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Com o intuito de expressar os resultados de forma a inferirem-se conclusões sobre uma população com base em uma pequena amostragem aleatória, os dados foram organizados e analisados. Para a análise, utilizou-se a estatística descritiva, e, quando necessário, a análise de variância seguida do teste de Newman Keulls, teste t de student, correlação de Pearson, além da análise de regressão. A análise dos dados foi realizada com o auxílio do *software GraphPad Prism 5*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO

Com o intuito de obter um processo extrativo eficiente para as antocianinas, foram aplicados alguns testes, nos quais o tempo de extração, a relação massa de fruto e volume de líquido extrator, o tipo de líquido extrator e as concentrações de ácido utilizadas foram distintos. Para a realização das extrações, foi escolhido apenas o cultivar Monte Rey, e todas foram feitas com o auxílio de banho de ultrassom, sob temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os resultados foram comparados com base nos teores de antocianinas totais obtidos pela técnica de CLAE, e as diferenças estatísticas foram avaliadas por análise de variâncias (ANOVA) utilizando-se o teste de Newman-Keuls, com nível de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5.1.1 Líquido extrator

Na literatura, existem diversos estudos demonstrando a utilização de solventes (metanol, etanol e acetona) como solução utilizada para a extração de antocianinas. Segundo Revilla, Ryan, Martin-Ortega (1998), soluções contendo metanol acidificado são mais eficientes para a extração de antocianinas em frutos de uva. Por outro lado, Kajdzanoska, Petreska e Stefova (2011) testaram diferentes soluções extrativas e diferentes concentrações de ácido para a extração de antocianinas em frutos de morango. Os resultados demonstraram não existir diferença entre as extrações com metanol e metanol acidificado.

Neste trabalho, os resultados para as soluções não-acidificadas, indicaram que a solução metanólica foi a mais eficiente, apresentando diferença significativa frente à utilização de metanol 70%, etanol e etanol 70% (Tabela 1). Os resultados preliminares obtidos corroboram os descritos por Kajdzanoska, Petreska e Stefova (2011), demonstrando que o extrato metanólico, quando comparado a soluções não acidificadas, apresenta melhores resultados.

Tabela 1 – Teor de antocianinas totais em diferentes soluções extratoras não ácidas

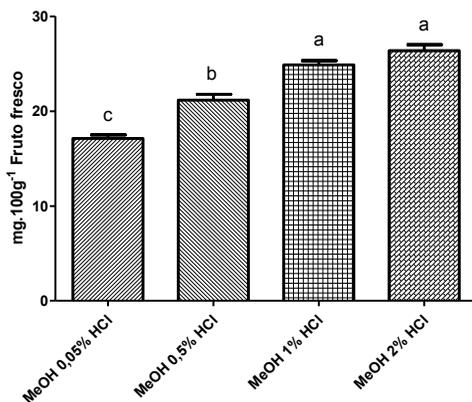
Solução extratora	Teor de antocianinas totais ¹
Etanol	17,34 ± 0,6732 b
Etanol 70%	17,66 ± 0,4299 b
Metanol	20,88 ± 0,7742 a
Metanol 70%	17,83 ± 0,4769 b

¹Valores expressos como a média em equivalente de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo por 100 g de fruto fresco ± erro padrão. Letras diferentes significam diferença estatística significativa (ANOVA, seguido por teste de Newman-Keuls; $p < 0,05$).

A partir dos resultados com soluções não-acidificadas, extratos utilizando soluções metanólicas acidificadas com diferentes concentrações de ácido clorídrico foram testados. Segundo Bordignon Jr. et al. (2009), extratos, contendo concentrações de ácido capazes de manter o pH em torno de 1, aumentam a eficiência de extração dos compostos antocianínicos em frutos de *F. x ananassa*.

Os resultados apresentados na Figura 8 demonstram que extrações contendo de 1 a 2% de HCl são mais eficientes quando comparadas com concentrações menores de ácido, o que corrobora os resultados descritos por Bordignon Jr. et al. (2009). No entanto, não foi verificada diferença significativa entre as duas maiores concentrações de ácidos utilizadas, o que justifica a escolha da concentração de ácido de 1% para as análises, em virtude de minimizar a ocorrência de reações de hidrólise.

Figura 8 – Teores de antocianinas totais empregando diferentes concentrações de ácido clorídrico na solução metanólica extratora. Letras diferentes significam diferença estatística significativa (ANOVA, seguido por teste de Newman-Keuls; $p < 0,05$).

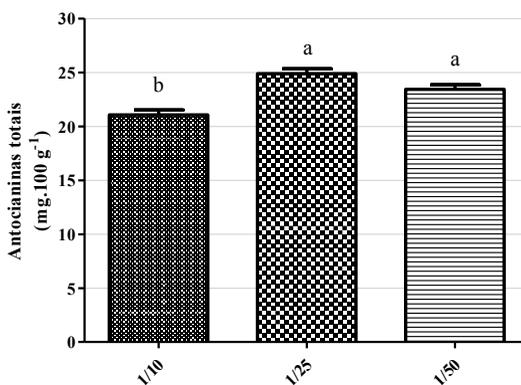


5.1.2 Relação massa de fruto e volume de líquido extrator

O volume de líquido extrator empregado para a extração de cada grama de fruto foi outra variável avaliada, visto que pequenos volumes podem não ser suficientes para extrair todo o conteúdo de metabólitos desejados. Sendo assim, a avaliação desse aspecto é relevante para a obtenção de uma extração exaustiva. Foram testadas as proporções de 10 mL, 25 mL e 50 mL de líquido extrator para cada grama de fruto a ser extraído, mantendo inalteradas as variáveis tempo de extração (75 min) e natureza do líquido extrator (metanol 1% HCl).

Com base nos resultados obtidos, foi possível padronizar a proporção de 25 mL de solução extrativa para cada grama de fruto, pois de acordo com os dados apresentados (Figura 9), os volumes de 25 e 50 mL foram mais eficientes, ou seja, capazes de extrair um teor maior de metabólitos quando comparados a 10 mL. Porém não foi encontrada diferença significativa entre eles, justificando, assim, a escolha da proporção de 25 mL para cada grama de fruto, reduzindo os resíduos gerados e, conseqüentemente, diminuindo os custos do processo.

Figura 9 – Teores de antocianinas totais em diferentes relações de massa de fruto e volume de solução extrativa. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).



5.1.3 Tempo de extração

O tempo de extração foi outra variável estudada, tendo sido comparados os teores de antocianinas em três diferentes tempos de extração (25, 50 e 75 minutos). Essa avaliação teve por objetivo a obtenção de um processo extrativo com o menor tempo possível, mas sem perder a eficiência. Com esse mesmo objetivo, o banho de ultrassom foi

a ferramenta utilizada, pois o rompimento das células provocado pelas ondas de ultrassom conduz a uma maior eficiência no processo extrativo (DE SOUZA BARBOZA; SERRA, 1992). Para a realização dessas extrações, as demais variáveis, como o tipo de solução e a proporção entre volume de solução extratora e massa de frutos (1:25 m/v), foram mantidas sem alterações.

Os resultados obtidos, apresentados na tabela 2, demonstram que não existe diferença significativa entre os períodos de tempo de 25 e 50 minutos, diferença também não observada entre 50 e 75 min, porém foi verificada diferença significativa entre 25 e 75 min, dado que direcionou a escolha do maior tempo de extração avaliado (75 min).

Tabela 2 – Teor de antocianinas totais obtidas por diferentes tempos de extração

Tempo de extração ¹	Teor de antocianinas totais ²
25	24,14 ± 0,4352 a
50	24,90 ± 0,4424 a,b
75	26,34 ± 0,6169 b

¹Valores expressos em minutos.

²Valores expressos como a média em equivalente de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo por 100 g de fruto fresco ± erro padrão. Letras diferentes significam diferença significativa (ANOVA, seguido por teste de Newman-Keuls; $p < 0,05$).

A otimização das variáveis envolvidas no processo extrativo, demonstraram que, a utilização de uma solução de metanol 1% HCl, com uma proporção de 25 mL de líquido extrator para cada 1 g de frutos e um tempo de 75 min de extração, constituíram as condições ideais para a obtenção de uma extração exaustiva dos compostos antociânicos. Todas as demais análises realizadas na presente dissertação utilizaram extratos preparados nas condições acima descritas.

5.2 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM FRUTOS DE *Fragaria x ananassa*

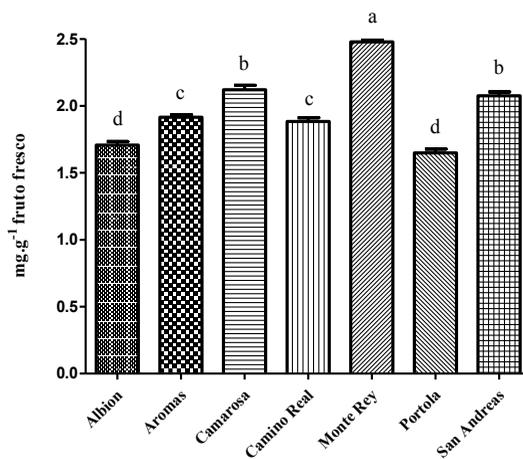
Os teores de compostos fenólicos totais em frutos de *F. x ananassa* foram determinados pelo método de Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999) e pelo método do Sal de diazônio Fast Blue BB, desenvolvido, mais recentemente, por Medina (2011b). Sendo assim, foi possível uma comparação entre as técnicas, demonstrando as possíveis diferenças existentes com base, principalmente, nos interferentes presentes na técnica de Folin-Ciocalteu (MEDINA, 2011a).

5.2.1 Método de Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu (FC) trata-se da técnica mais descrita na literatura para a quantificação de compostos fenólicos totais, devido ao fato de ser uma técnica reprodutível, com entendimento simples e de grande aplicação (FOLIN; CIOCALTEU, 1927; LESTER et al., 2012; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). O método é baseado na medição indireta dos compostos fenólicos, através da transferência de elétrons para o complexo formado por fosfotungstato e molibdatos presentes no reagente de FC, resultando na formação de cor azul, com detecção em 760 nm. Porém, a presença de alguns compostos não fenólicos na amostra pode gerar interferência nos resultados. Dentre esses compostos podemos citar aminas aromáticas, açúcares, purinas, entre outros (FOLIN; CIOCALTEU, 1927; MEDINA, 2011b).

Os resultados obtidos, expressos no gráfico abaixo (Figura 10), não foi observada diferenças significativas existente entre os cultivares Albion e Portola, assim como entre Aromas e Camino Real e também entre os cultivares Camarosa e San Andreas. Dentre os cultivares estudados, o cultivar Monte Rey foi o que apresentou os maiores teores de composto fenólicos pela técnica de FC ($2,48 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

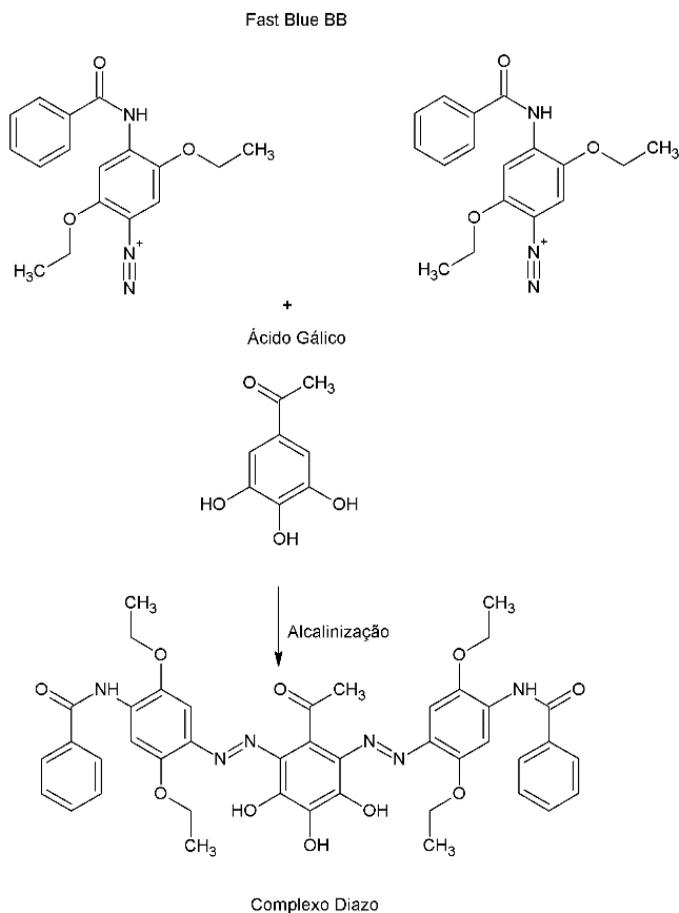
Figura 10 – Teor de compostos fenólicos totais pela técnica de Folin-Ciocalteu. Letras diferentes significam diferença estatística significativa (ANOVA, seguido por teste de Newman-Keuls; $p < 0,05$).



5.2.2 Método Fast Blue BB

A técnica conhecida como Fast Blue BB (FBBB) destaca-se pela simplicidade, rapidez e pela detecção direta de compostos fenólicos e polifenólicos. A reação é baseada no acoplamento entre o sal de diazônio Fast Blue BB e os compostos fenólicos, a qual ocorre em meio levemente alcalino, resultando na formação de complexos tipo “azo” (Figura 11), quantificados por espectrofotometria em 420 nm. A principal vantagem da técnica consiste na eliminação de possíveis interferentes não fenólicos, como ocorre na metodologia de Folin-Ciocalteu (MEDINA, 2011b;a).

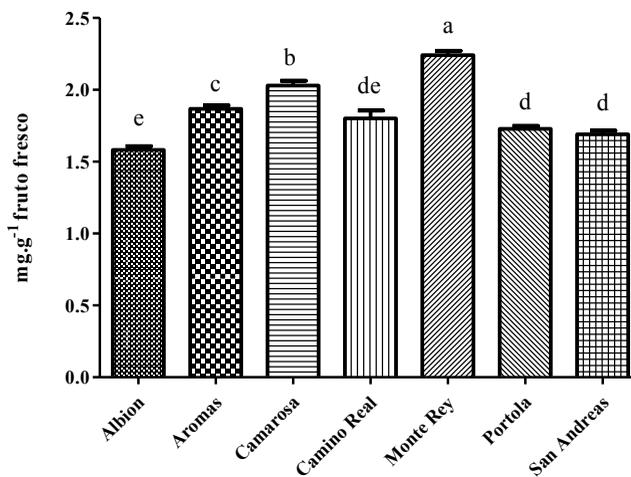
Figura 11 – Interação proposta entre o ácido gálico e o sal de diazônio Fast Blue BB



Fonte: Medina (2011a)

Assim como nos resultados obtidos pela técnica de FC, o cultivar Monte Rey foi o que apresentou os maiores teores de compostos fenólicos pela técnica de FBBB ($2,25 \text{ mg.g}^{-1}$). Além disso, os resultados demonstraram não existir diferença significativa em os cultivares Albion e Camino Real, além de também não ter sido detectada diferença nos TFT dos cultivares San Andreas, Portola e Camino Real (Figura 12).

Figura 12 - Teor de compostos fenólicos totais pela técnica de Fast Blue BB. Letras diferentes significam diferença estatística significativa (ANOVA, seguido por teste de Newman-Keuls; $p < 0,05$).



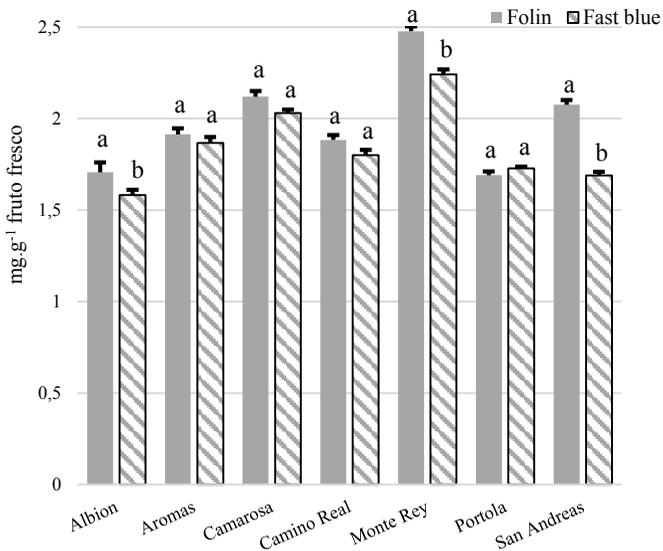
5.2.3 Comparação das técnicas FC e FBBB

Visando a avaliar a eficiência das técnicas de Folin-Ciocalteu e Fast Blue BB, os resultados foram comparados e correlacionados para detectar a presença de possíveis interferentes, principalmente na técnica de FC.

Os resultados encontrados em nossas análises foram opostos aos descritos por Lester et al. (2012), que, comparando as técnicas de FBBB e FC, demonstraram teores mais elevados de compostos fenólicos em frutos de morango, utilizando a técnica de FBBB. A partir da comparação dos resultados obtidos, foi possível observar que os teores de compostos fenólicos obtidos pela técnica de FC são iguais ou superiores aos obtidos pela técnica de FBBB. As diferenças encontradas podem ser justificadas pela quantificação não específica da técnica de FC, a qual pode sofrer

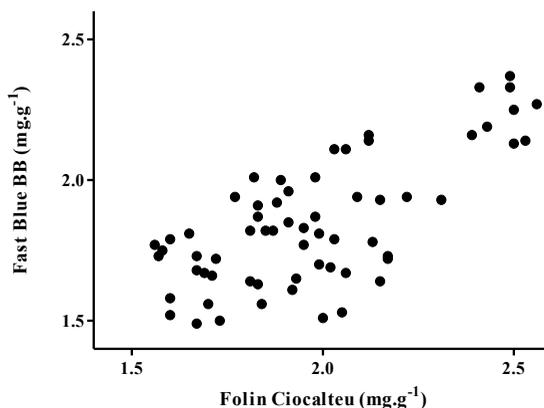
interferência de compostos não fenólicos na quantificação, como açúcares, superestimando, dessa forma, os teores de fenólicos totais (Figura 13).

Figura 13 – Comparação dos teores de compostos fenólicos por cultivar entre as diferentes técnicas de quantificação utilizadas no mesmo cultivar. Letras diferentes indicam diferença significativa (teste t de Student, $p < 0,05$)



Para avaliar a correlação entre as duas técnicas, um teste de correlação de Pearson foi plotado. Como resultado, foi verificada uma correlação significativa ($r = 0,71$; $p < 0,0001$) entre as técnicas de Folin-Ciocalteu e Fast Blue BB (Figura 14).

Figura 14 – Correlação de Pearson entre os teores de compostos fenólicos totais, pelas técnicas de Folin-Ciocalteu e Fast Blue BB ($r = 0,7107$; $p < 0,0001$)



5.3 TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS EM FRUTOS DE *Fragaria x ananassa*

A quantificação das antocianinas presentes nos frutos de morango foi realizada por meio de duas técnicas. Primeiramente através da metodologia conhecida como pH diferencial, quantificando a totalidade das antocianinas monoméricas. Outra metodologia adotada foi a quantificação das antocianinas de forma individual e também total por CLAE/DAD.

5.3.1 pH diferencial

O método do pH diferencial, conhecido como principal técnica para a determinação espectrofotométrica de antocianinas monoméricas, destaca-se pela rapidez, eficiência e, principalmente, pelo baixo custo, em virtude de não necessitar da utilização direta de substâncias de referência. Essa metodologia recebeu a aprovação, em 2005, da *Association of Analytical Communities (AOAC)*, sendo classificada como método oficial (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005; LEE; RENNAKER; WROLSTAD, 2008).

O método é baseado na alteração estrutural reversível sofrida pelas antocianinas monoméricas, em pH 1 e 4,5. Considerando que, em pH 1, as antocianinas estão com a maior intensidade de cor, e, em pH 4,5, apresentam-se incolores, torna-se possível mensurar sua concentração, pois a diferença de absorbância no comprimento máximo de absorção é proporcional a essa concentração. Em relação às antocianinas poliméricas, a técnica não pode ser empregada, pois, em ambas as faixas de pH, apresentarão coloração (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005).

A utilização do coeficiente de absorvidade molar correto torna-se indispensável para obtenção da concentração final das antocianinas monoméricas, visto que a utilização de substâncias de referência é dispensável. Dessa forma, o coeficiente pode ser obtido a partir de dados disponíveis na literatura, ou, ainda, com a aplicação da Lei de Lambert-Beer, na qual há a necessidade de emprego de substância de referência.

Com o intuito de obter uma quantificação confiável, o coeficiente de absorvidade molar utilizado foi calculado com o auxílio da Lei de Lambert-Beer, já que as informações disponíveis na literatura apresentam grandes variações. Sendo assim, foi utilizado, como padrão, pelargonidina-3-*O*-glicosídeo por ser a antocianina presente majoritariamente nos frutos de morango. O emprego da equação derivada da Lei de Lambert-Beer gerou um coeficiente de $25660 \text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, em uma solução metanólica com 1% HCl. Os teores de antocianinas monoméricas totais foram calculados conforme equação descrita anteriormente no item 4.4.1, utilizando-se, para isso, o coeficiente de absorvidade molar calculado.

Com base nos resultados descritos na literatura, podemos observar grande variação de concentração de antocianinas monoméricas totais em frutos de morango, o que, provavelmente, está relacionado com as características genéticas dos cultivares, as quais são capazes de não apenas alterar os constituintes químicos, mas também influenciar nos seus teores.

Porém, outro aspecto envolvido nas quantificações realizadas pelo método do pH diferencial é o valor do coeficiente de extinção molar utilizado, o qual apresenta grandes variações descritas na literatura. A partir de um trabalho de revisão realizado por Giust e Wrolstad (2001) (Tabela 3), é possível observar a variação de coeficientes de extinção molar (ϵ) para as antocianinas.

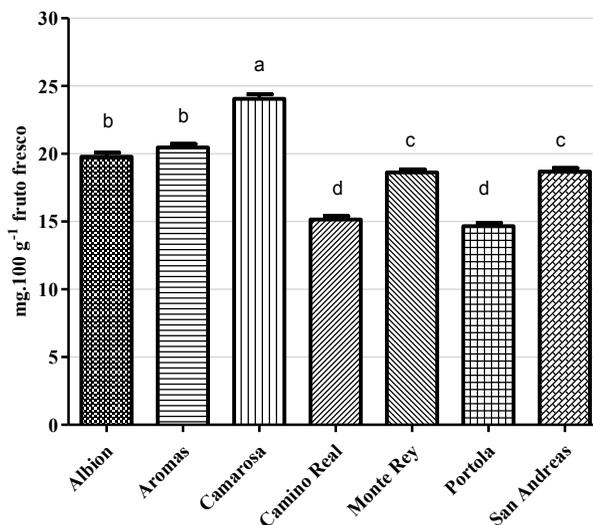
Tabela 3 – Absorvidade molar descrita para pelargonidina-3-*O*-glicosídeo

	Sistema de solvente	Comprimento máximo de absorção (nm)	ϵ
Pelargonidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	1% HCl em água	496	27300
	1% HCl	513	22390
	1% HCl em etanol	516	31620
	0,1% HCl em metanol	508	17330
	Tampão 0,025 M cloreto de potássio (pH 1)	496	15600

Fonte: Adaptado de Giust e Wrolstad (2001)

A partir do coeficiente de absorvidade molar obtido, os resultados foram calculados, e estão apresentados na figura 15. Os teores de antocianinas monoméricas totais não apresentaram diferença significativa entre os cultivares Albion e Aromas; Camino Real e Portola e ainda entre Monte Rey e San Andreas. Comparados os resultados é possível observar que o cultivar Camarosa é a amostra que apresentou os maiores teores de antocianinas monoméricas entre os cultivares investigados (23,72 mg. 100 g⁻¹).

Figura 15 - Teor de antocianinas monoméricas totais pelo método do pH diferencial. Letras diferentes significam diferença estatística significativa (ANOVA, seguido por teste de Newman-Keuls; $p < 0,05$).



5.3.2 Análise por CLAE

A quantificação das antocianinas presentes nos frutos de morango, além de ter sido realizada pelo método do pH diferencial, foi determinada também pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. As análises visavam à identificação e quantificação das antocianinas de forma individual, sendo que, para isso, uma metodologia foi desenvolvida e validada.

Essa metodologia visou à obtenção de um cromatograma que atendes os parâmetros analíticos necessários para a quantificação das substâncias de interesse. A quantificação foi efetuada a partir de utilização de padrão externo, e a metodologia validada para os padrões pelargonidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo, os quais são as

antocianinas majoritárias no extrato de frutos de morango. A validação analítica teve como objetivo dar confiabilidade aos resultados com um nível aceitável de incerteza.

5.3.2.1 Validação dos parâmetros analíticos

O presente trabalho adotou a padronização estabelecida pela *International Conference on Harmonization* (ICH - GUIDELINE, 2005), avaliando os parâmetros analíticos abaixo:

- ✓ Faixa de linearidade;
- ✓ exatidão;
- ✓ precisão;
- ✓ especificidade;
- ✓ limite de quantificação;
- ✓ limite de detecção.

5.3.2.1.1 Faixa de linearidade

A faixa de linearidade foi calculada a partir de equação da reta, conhecida como curva analítica, a partir de injeções em triplicata das oito (8) diferentes concentrações de cada substância de referência.

Os resultados expressos abaixo (Tabela 4) demonstram a faixa de linearidade testada e os coeficientes de determinação, sendo possível concluir que a faixa de concentração estudada apresenta-se linear, demonstrando que os resultados são proporcionais às concentrações da faixa testada, o que garante a eficiência da metodologia desenvolvida.

Tabela 4 – Parâmetros de avaliação da linearidade

Antocianinas	Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r^2
Pelargonidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	0,625 – 100	0,9996
Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	0,625 – 100	0,9992

r^2 = coeficiente de determinação.

5.3.2.1.2 Exatidão

A exatidão foi avaliada a partir do ensaio de recuperação, o qual utilizou as concentrações 100, 50 e 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para realizar as análises. Os resultados obtidos expressos na tabela abaixo (Tabela 5) demonstram a exatidão do método, sendo que para pelargonidina-3-*O*-glicosídeo o percentual de recuperação foi $105,5\% \pm 5$, enquanto que para cianidina-3-*O*-glicosídeo o resultado demonstrou uma recuperação de $104,4\% \pm 4$. Segundo AOAC (2002), a faixa de recuperação recomendada para

analitos de origem vegetal com alguma atividade biológica ou nutricional, em concentração na faixa de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, encontra-se entre 80 e 115%.

Tabela 5 - Análise do percentual de recuperação

Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Recuperação	
	Pelargonidina-3- <i>O</i> - glicosídeo*	Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo*
100	100,85 ± 1	100,72 ± 1
50	104,25 ± 1	103,20 ± 1
2,5	111,54 ± 4	109,26 ± 1
Média	105,5 ± 5	104,4 ± 4

*Valores expressos como a média em percentual ± CV%

5.3.2.1.3 Precisão

A precisão é utilizada para avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, tendo como resultado o coeficiente de variação (CV%) entre as análises. A precisão foi determinada em dois níveis, repetibilidade e precisão intermediária. A partir da análise dos resultados expressos na tabela 6, é possível verificar que todos encontram-se abaixo de 6%, limite considerado pela AOAC (2002) adequado para a concentração em questão. Sendo assim, é possível considerar o método preciso perante as exigências estabelecidas.

Tabela 6 – Análise da repetibilidade e precisão intermediária

	Repetibilidade*			Precisão intermediária*		
	3,12	12,5	50	3,12	12,5	50
Pelargonidina-3- <i>O</i> - glicosídeo**	2,1	0,8	0,4	1,6	1,1	1,5
Cianidina-3- <i>O</i> - glicosídeo**	2,5	1	0,7	1,8	1,3	1,4

*Valores expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

** Valores expressos em CV (%)

5.3.2.1.4 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada a partir da co-injeção da amostra mais os padrões. Dessa forma, foi possível observar o aumento proporcional das áreas dos picos correspondentes a cada padrão. Outra forma utilizada para a determinação do mesmo parâmetro foi a verificação do grau de pureza dos picos relativos aos padrões, a qual é possível devido à utilização do detector DAD. O detector referido fornece

informações a partir da análise do espectro de UV-Vis dos picos, possibilitando concluir sobre sua pureza. Com base nas duas técnicas descritas, foi possível verificar que o método possui especificidade para as substâncias de interesse, ou seja, o método é capaz de quantificar o composto de interesse sem a interferência de outras substâncias (coluição).

5.3.2.1.5 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção é responsável por determinar a menor quantidade de analito detectável em uma amostra com confiabilidade, enquanto que o limite de quantificação se refere à menor concentração do analito presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis como base em condições preestabelecidas (AOAC, 2002; ICH - GUIDELINE, 2005). Os resultados encontrados (Tabela 7) demonstram que o método apresenta boa sensibilidade, corroborando os resultados encontrados por Bordonaba, Crespo e Terry (2011), os quais, em metodologia semelhante para a quantificação de antocianinas em frutos de cassis, apresentaram teores para os LD e LQ de 0,24 e 0,82 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, para cianidina-3-*O*-glicosídeo.

Tabela 7 – Limites de detecção e quantificação

	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Pelargonidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	0,15	0,48
Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	0,25	0,77

LD – Limite de detecção; LQ – Limite de quantificação

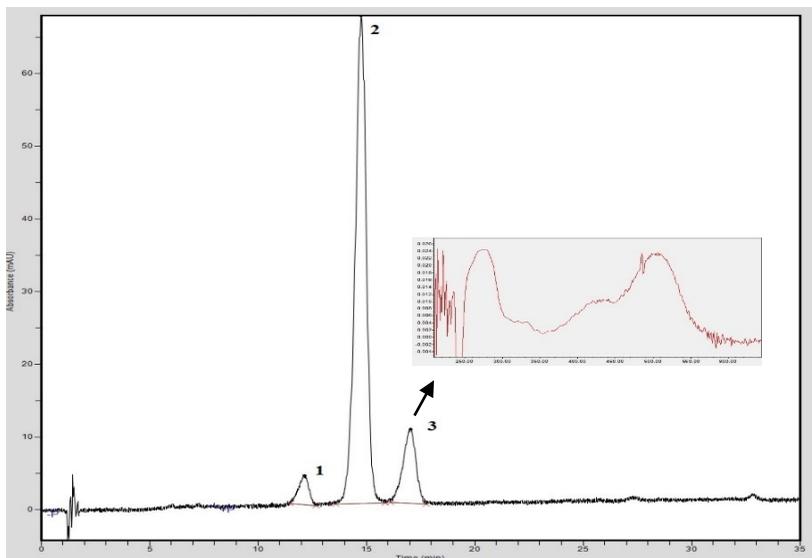
5.3.2.2 Teor de antocianinas

Com base no cromatograma obtido (Figura 16), é possível a visualização de 3 compostos majoritários, sendo a cianidina-3-*O*-glicosídeo o pico número 1, e a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo o pico número 2, os quais apresentaram tempos de retenção de 11,9 e 14,8 min, respectivamente. Estes compostos foram identificados através da comparação dos tempos de retenção, dos espectros de UV-Vis e co-injeção com os respectivos padrões. Devido à indisponibilidade de padrão comercial, o pico número 3, com tempo de retenção de 17,0 min, foi identificado como um derivado da pelargonidina através do espectro UV-Vis, e, pela comparação com os dados da literatura, foi possível sugerir que seja a pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo.

O perfil qualitativo de antocianinas manteve-se inalterado em todos os cultivares estudados, não apresentando alterações mesmo

quando da presença de substâncias minoritárias. Os resultados encontrados corroboram com os dados previamente relatados por diversos autores, os quais descreveram a presença dessas três antocianinas como as majoritárias para a espécie (AMARO et al., 2013).

Figura 16 – Cromatograma do extrato de frutos de morango por CLAE/DAD com detecção em 520 nm



Os teores de antocianinas foram calculados de forma individual (Tabela 8), ou seja, cada substância foi quantificada com base em uma curva analítica do respectivo padrão, exceto a substância número 3, a qual foi quantificada a partir da curva analítica da pelargonidina-3-*O*-glicosídeo.

Tabela 8 – Teores de antocianinas individualmente por CLAE nas diferentes cultivares

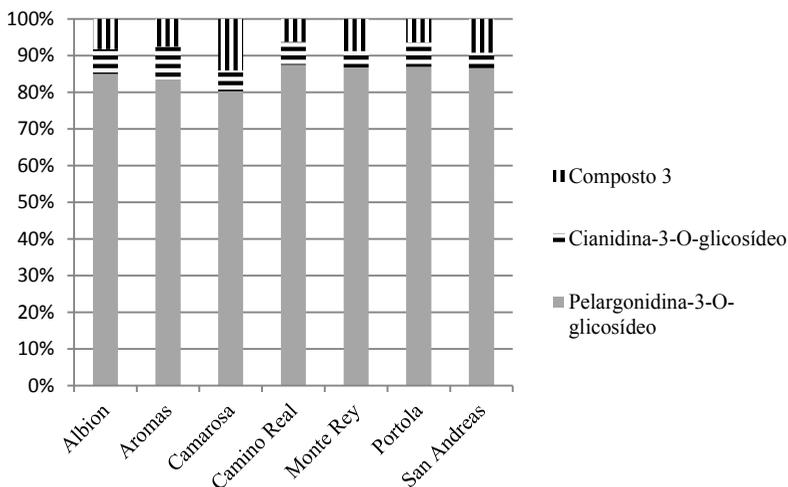
Cultivar	Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo*	Pelargonidina-3- <i>O</i> -glicosídeo*	Composto 3**
Albion	1,32 ± 0,07	18,60 ± 1,27	2,00 ± 0,14
Aromas	1,99 ± 0,07	18,31 ± 1,39	1,66 ± 0,14
Camarosa	1,57 ± 0,05	22,30 ± 0,69	3,94 ± 0,05
Camino Real	1,00 ± 0,04	14,05 ± 0,42	1,01 ± 0,02
Monte Rey	1,05 ± 0,03	20,71 ± 0,22	2,09 ± 0,13
Portola	1,28 ± 0,04	15,41 ± 1,43	1,21 ± 0,08
San Andreas	0,83 ± 0,03	16,16 ± 1,53	1,82 ± 0,06

*Valores expressos em mg.100 g⁻¹ por 100 g de fruto fresco ± S

**Valores expressos em mg de equivalentes de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo por 100 g de fruto fresco ± S

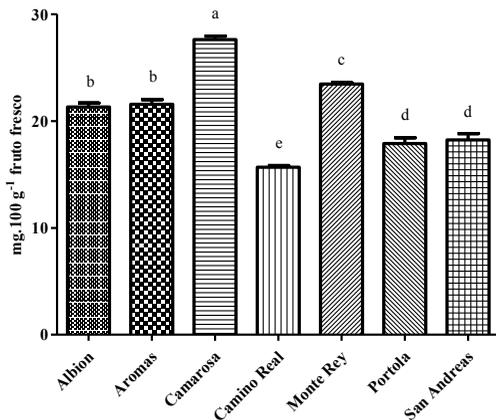
Com base nos resultados obtidos, podemos destacar a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo como a antocianina majoritária de todos os cultivares analisados. Os valores demonstraram que os teores desse composto variam entre 80,3%, para o cultivar Camarosa até 87,5% para o cultivar Camino Real (Figura 17). A identificação da pelargonidina-3-*O*-glicosídeo como constituinte majoritário confirma o que está descrito na literatura, pois, segundo Aaby, Skrede e Wrolstad (2005), os teores relativos dessa antocianina variaram de 64,3% para o cultivar Polka e 75% para o cultivar Blink. Já Kelenek e Selli (2011), analisando extratos do cultivar Camarosa e Osmanli, detectaram teores de 80,7% e 81,4%, respectivamente, para esse composto.

Figura 17 - Gráfico representando o teor relativo de cada antocianina em função do total de antocianinas presente no extrato de frutos dos diferentes cultivares



Além de quantificadas de forma isolada, os teores totais também calculados a partir da quantificação por CLAE/DAD, expressando os resultados em equivalentes de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo, antocianina majoritária nos frutos de morango. O gráfico a seguir (Figura 18) representa os teores de antocianinas totais presentes nos frutos, confirmando os dados obtidos pelo método do pH diferencial, onde o cultivar Camarosa apresentou os maiores teores de antocianinas (27,10 mg.100 g⁻¹). Também é possível concluir que não foram observadas diferenças significativas entre os cultivares Albion e Aromas assim como entre Portola e San Andreas.

Figura 18 - Teor de antocianinas totais por CLAE. Letras diferentes significam diferença estatística significativa (ANOVA, seguido por teste de Newman-Keuls; $p < 0,05$).



5.4 CULTIVARES X COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Os resultados obtidos nas determinações tanto do teor de compostos fenólicos totais, como da concentração de antocianinas totais, evidenciaram a existência de variação nos teores dos referidos compostos em função do cultivar analisado. As comparações também foram realizadas entre as técnicas utilizadas para as quantificações, com intuito de comparar técnicas clássicas, como a técnica de FC, com outras mais recentes, como a FBFB.

5.4.1 Albion

Em frutos do cultivar Albion foram detectados, a partir da técnica de FC, teores de compostos fenólicos totais na faixa de 1,71 mg EAG.g⁻¹ FF, resultado que apresentou diferença significativa em relação ao TFT, determinado pela técnica de FBFB (1,58 mg EAG.g⁻¹ FF). Em estudo realizado por Ornela-Paz (2013), compostos fenólicos totais foram quantificados em frutos deste cultivar, apresentando, como resultado, um teor de 1,95 mg EAG.g⁻¹ FF.

As técnicas do pH diferencial e CLAE foram utilizadas visando à quantificação de antocianinas totais nos frutos do cultivar Albion. Os resultados obtidos foram considerados estatisticamente iguais, apesar da diferença absoluta existente, que pode ser observada a partir dos respectivos teores, 19,78 e 21,31 mg equivalentes de pelargonidina-3-O-glicosídeo por 100 g⁻¹ FF.

Copetti et al. (2012), em análise de frutos do cultivar Albion, detectaram a presença de antocianinas totais na concentração de 22,27 mg.100 g⁻¹, resultado próximo ao descrito no presente trabalho (19,78 mg equivalentes de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo por 100 g⁻¹ FF). Por outro lado, Ornelas-Paz et al. (2013) apresentaram teores de 56,4 mg equivalentes de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo por 100 g de fruto fresco, empregando o método do pH diferencial. Os autores utilizaram 17330 L.M⁻¹.cm⁻¹ como coeficiente de absorvidade molar, o que pode justificar o teor elevado de compostos antocianínicos.

5.4.2 Aromas

Os compostos fenólicos totais detectados em frutos do cultivar Aromas não apresentaram diferença significativa entre as quantificações realizadas pelas técnicas de FC e FBBB. Os resultados demonstram a presença de 1,91 e 1,87 mg EAG.g⁻¹ FF obtidos pelas respectivas técnicas. Os teores de fenólicos totais em frutos do cultivar Aromas também foram objeto de estudo de Hernanz et al. (2007), sendo detectados 2,08 mg.g⁻¹ FF, resultados semelhantes ao obtido em nosso trabalho (1,91 mg EAG.g⁻¹ FF).

No que concerne ao teor de antocianinas totais no cultivar Aromas, poucos são os dados disponíveis na literatura. Segundo Hernanz et al. (2007), frutos de morango do cultivar Aromas apresentam teores de antocianinas totais em torno de 15,71 mg.100 g⁻¹, resultados inferiores aos aqui apresentados (21,57 mg.100 g⁻¹ de fruto) através da técnica de CLAE/DAD. O método do pH diferencial também foi utilizado para a quantificação do TFT, através do qual foram detectados 20,47 mg.100 g⁻¹ FF, resultado que não apresenta diferença significativa em comparação ao teor detectado por CLAE.

5.4.3 Camarosa

Em relação aos teores de fenólicos totais, o cultivar Camarosa apresentou, em sua composição, 2,12 mg EAG.g⁻¹ FF, teores obtidos a partir da quantificação pela técnica de FC, valores que não apresentaram diferença significativa em relação aos teores obtidos pela técnica de FBBB (2,03 mg EAG.g⁻¹ FF).

Padula et al. (2013) analisaram o teor de compostos fenólicos totais em frutos do cultivar Camarosa, obtendo, como resultado, 1,36 mg EAG.g⁻¹ FF, valores inferiores aos obtidos nesta pesquisa para o mesmo cultivar (2,12 mg EAG.g⁻¹ FF). Resultados semelhantes foram descritos em estudo de Cantillano et al. (2012), que determinaram os TFT nos frutos do mesmo cultivar e obtiveram, como resultado, 1,27 mg EAG.g⁻¹

FF. Já Singh et al. (2011) detectaram teores de compostos fenólicos totais de 0,98 mg EAG.g⁻¹ FF, valor inferior em mais de 50% ao detectado neste estudo.

No que concerne a antocianinas totais, o cultivar Camarosa foi o que apresentou maiores teores, de 27,62 e 24,05 mg equivalentes de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo por 100 g⁻¹ FF para as técnicas por CLAE/DAD e pH diferencial, respectivamente, valores estes que não possuem diferença significativa entre si.

Segundo Odriozola-Serrano, Soliva-Fortuny e Martin-Belloso (2009), frutos de *F. x ananassa* cultivar Camarosa apresentam teores de antocianinas monoméricas totais quantificadas através do método do pH diferencial, na faixa de 40 mg de equivalente de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo por 100 g fruto fresco, valores superiores aos aqui detectados. Por outro lado, Amaro et al. (2013) e Cerezo et al. (2010) verificaram resultados semelhantes aos do presente trabalho, com teores de 26,38 mg.100 g⁻¹ e 30 mg.100 g⁻¹, respectivamente, em frutos do mesmo cultivar.

5.4.4 Camino Real

No cultivar Camino Real, foram detectados teores de fenólicos totais na faixa de 1,88 mg EAG por g de fruto fresco para as análises realizadas por FC, resultados que não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos teores detectados pela técnica análoga, conhecida como FBBB, cujo valor obtido foi de 1,80 mg EAG por g de fruto fresco.

Nossos resultados corroboram os dados de Pineli et al. (2011), que, em estudo realizado com frutos do cultivar Camino Real, obtiveram teores de fenólicos totais semelhantes (1,74 mg EAG.g⁻¹ FF). Em trabalho mais recente, Pineli et al. (2012) detectaram, no mesmo cultivar, uma variação nos teores de TFT em função da sazonalidade com resultados que variaram de 1,78 a 2,69 para os meses de maio e setembro, respectivamente. Já em estudo realizado por Cantillano et al. (2012), os teores de fenólicos totais detectados foram de 1,18 mg EAG.g⁻¹ FF, valores inferiores aos descritos em nosso trabalho.

Da mesma forma que para os demais cultivares, os teores de antocianinas totais foram quantificados por meio do método do pH diferencial e através de metodologia por CLAE/DAD. Os resultados obtidos não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si, sendo verificados teores de 15,16 (pH diferencial) e 15,67 mg.100 g⁻¹ de frutos (CLAE/DAD). Nossos resultados são semelhantes aos descritos por Cantillano et al. (2012), que descreveram a presença de 16,57 mg equivalentes de cianidina-3-*O*-glicosídeo por 100 g⁻¹ em frutos

do mesmo cultivar. Em contrapartida, Pinelli et al. (2011) descreveram teores na faixa de 29,2 mg.100 g⁻¹ de antocianinas totais, superiores aos aqui apresentados e que demonstram, novamente, a ampla variação nos teores de antocianinas em morangos.

5.4.5 Monte Rey

Em relação aos frutos do cultivar Monte Rey, foi possível quantificar, a partir da técnica de FC, os teores de compostos fenólicos totais, sendo obtida uma concentração de 2,48 mg EAG.g⁻¹ FF, resultados superiores aos detectados pela técnica de FBBB, a qual apresentou teor de 2,24 mg EAG.g⁻¹ FF. Esses valores são inferiores aos encontrados por Ugolini et al. (2014) e Diamanti et al. (2012), que detectaram, respectivamente, a presença de 1,52 e 1,77 mg EAG.g⁻¹ FF nos frutos do cultivar Monte Rey, através da técnica de FC.

Conforme realizado com os demais cultivares, os compostos antociânicos foram quantificados nos frutos do cultivar Monte Rey por meio da técnica de CLAE/DAD e pelo método do pH diferencial. Os resultados obtidos demonstram diferença significativa entre as técnicas, com os teores 23,46 e 18,63 mg equivalentes de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo por 100 g⁻¹ FF para técnicas por CLAE/DAD e pH diferencial, respectivamente. Lester et al. (2012) obtiveram, por CLAE/DAD, teores de antocianinas totais próximos aos detectados em nosso trabalho (18,77 mg.100 g⁻¹ FF). Já Diamanti et al. (2012), através do método do pH diferencial, detectaram um teor de 26,1 mg de equivalentes de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo. Cabe destacar que a diferença observada entre os teores por nós verificados e os descritos no trabalho de Diamanti et al. (2012) pode estar relacionada ao coeficiente de extinção molar de 15600 utilizado pelos autores.

5.4.6 San Andreas

A quantificação de compostos fenólicos totais em frutos do cultivar San Andreas, demonstrou, uma variação nas concentrações de 2,08 e 1,69 mg EAG.g⁻¹ FF para as técnicas FC e FBBB, respectivamente. A diferença existente entre os resultados obtidos pelas técnicas, apresentou-se estatisticamente diferente. Já a quantificação das antocianinas totais não apresentou diferença significativa entre os teores obtidos pelo método do pH diferencial e por CLAE/DAD, sendo 18,69 e 18,24 mg equivalentes de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo por 100 g de fruto fresco os valores respectivos detectados para as respectivas técnicas.

Lester et al. (2012) determinaram os teores de compostos fenólicos totais e antocianinas totais por meio de CLAE, obtendo 0,28 mg.g⁻¹ FF de

TFT, e os teores de antocianinas totais apresentaram concentração de 15,52 mg.100 g⁻¹ FF. Os resultados descritos para os compostos fenólicos totais apresentam-se relativamente baixos, em comparação aos resultados encontrados em nosso trabalho (2,08 mg EAG.g⁻¹ FF), além de discrepantes dos demais resultados obtidos em todos os cultivares.

5.4.7 Portola

Os resultados obtidos a partir da quantificação pela técnica de FC demonstram que frutos do cultivar Portola possuem, em sua composição, teores de fenólicos totais na faixa de 1,65 mg EAG.g⁻¹ FF. Os teores de fenólicos resultantes da técnica de FC não diferem significativamente dos obtidos pela técnica de FBBB, que detectou concentração em torno de 1,73 mg EAG.g⁻¹ FF.

Em referência aos teores de antocianinas totais nos frutos do cultivar Portola, pode ser verificada diferença significativa quando os resultados das duas técnicas de quantificação (pH diferencial e CLAE) foram comparados. Os teores detectados por CLAE (17,89 mg. 100 g⁻¹ FF) apresentaram-se superiores aos quantificados pelo método espectrofotométrico do pH diferencial (14,65 mg.g⁻¹ FF).

O cultivar Portola, assim como o San Andreas, possui, na literatura, um número restrito de trabalhos, especialmente no que diz respeito a compostos fenólicos. Na literatura foi encontrado apenas o estudo realizado por Lester et al. (2012) o qual descreve os teores de compostos fenólicos totais e antocianinas em frutos do cultivar Portola. A quantificação dos compostos fenólicos totais e das antocianinas, realizada por CLAE, detectou o TFT na faixa de 0,25 mg.g⁻¹, enquanto os teores de antocianinas totais estiveram em torno de 14,26 mg.100 g⁻¹ FF.

5.5 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CLAE E pH DIFERENCIAL

Os resultados dos teores de antocianinas totais obtidos através da quantificação por CLAE e pelo método do pH diferencial também foram comparados visando avaliar a eficiência da técnica espectrofotométrica, especialmente se considerarmos ser esta uma técnica mais simples, que necessita menos investimento e despende menos tempo para a realização. A comparação dos resultados foi realizada com a utilização do teste t de Student ($p < 0,05$), avaliando apenas as duas técnicas.

Como pode ser visualizado no gráfico abaixo (Figura 19), os teores de antocianinas totais mostraram-se superiores nas análises feitas por CLAE quando comparados com os teores detectados pelo método do pH diferencial. Apesar da diferença existente, foi possível verificar uma

correlação forte entre as duas técnicas (Figura 20), com coeficiente de correlação igual a 0,82 ($p < 0,0001$).

Figura 19 – Comparação dos teores de antocianinas totais por cultivar entre as diferentes técnicas de quantificação utilizadas. Letras diferentes indicam diferença significativa (teste t de Student, $p < 0,05$)

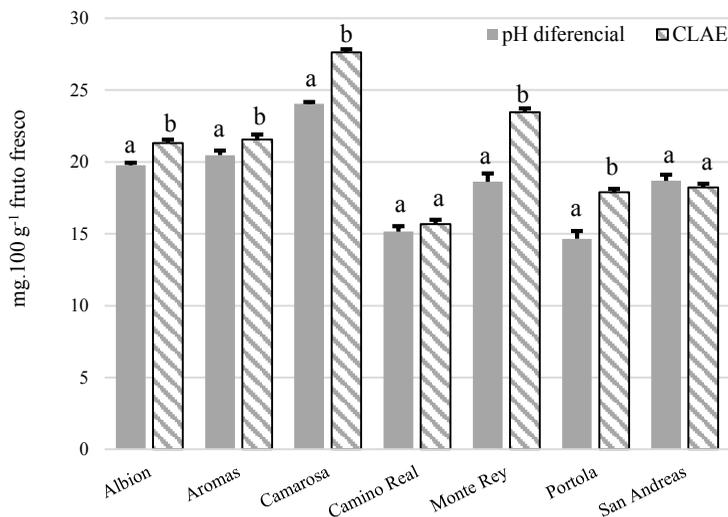
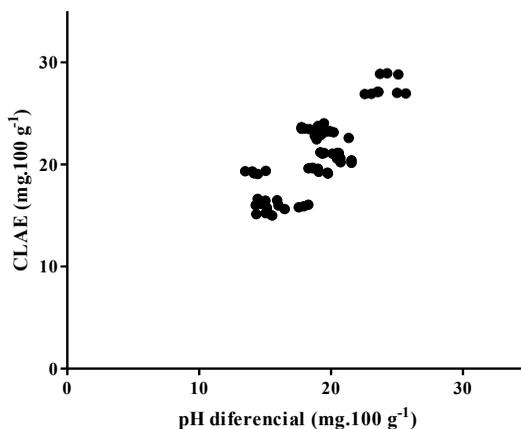


Figura 20– Correlação de Pearson entre os resultados obtidos nas análises de antocianinas totais por CLAE e pH diferencial ($r = 0,82$; $p < 0,0001$)



5.6 COMPARAÇÃO DOS TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS E ANTOCIANINAS TOTAIS ENTRE OS CULTIVARES

Os teores de compostos fenólicos e antocianinas totais apresentaram variações quando comparados nos diferentes cultivares. Pela técnica de Folin-Ciocalteu foi detectada a existência de uma variação entre os cultivares estudados de 1,65 a 2,48 mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de fruto fresco nos cultivares Portola e Monte Rey, respectivamente. A partir de comparação entre os teores dos compostos fenólicos totais, foi possível detectar que os cultivares Camarosa e San Andreas; Albion e Portola; Camino Real e Aromas não apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 9).

No que tange ao teor de antocianinas totais, os cultivares estudados apresentaram diferenças significativas, revelando a relação entre fatores genéticos e concentração de compostos antociânicos. Os maiores teores de antocianinas foram detectados no cultivar Camarosa, no qual foram observados teores de 27,62 mg.100 g⁻¹ (CLAE/DAD) (Tabela 9). Comparando os teores de antocianinas totais entre os cultivares (CLAE/DAD), não foi verificada diferença significativa entre os cultivares Albion e Aromas, assim como nos cultivares San Andreas e Portola. Para a comparação dos teores de antocianinas totais e fenólicos entre os cultivares, foi utilizada a análise de variância e, posteriormente, o teste de Newman-Keuls, o qual possibilitou demonstrar quais as diferenças existentes.

Tabela 9 – Teor de compostos fenólicos totais e antocianinas totais nos diferentes cultivares

Cultivar	FC ¹	FBBB ¹	pH diferencial ²	CLAE ²
Albion	1,71 ± 0,0273 d	1,58 ± 0,0264 e	19,78 ± 0,3076 d	21,31 ± 1,11 d
Aromas	1,91 ± 0,0194 a	1,87 ± 0,0257 b	20,47 ± 0,2474 d	21,57 ± 1,28 d
Camarosa	2,12 ± 0,0332 b	2,03 ± 0,0330 c	24,05 ± 0,3436 b	27,62 ± 0,94 b
Camino Real	1,88 ± 0,0284 a	1,80 ± 0,0548 ab	15,16 ± 0,2470 a	15,67 ± 0,45 a
Monte Rey	2,48 ± 0,0188 c	2,24 ± 0,0300 d	18,63 ± 0,2278 c	23,46 ± 0,36 c
Portola	1,65 ± 0,0285 d	1,73 ± 0,0202 a	14,65 ± 0,2444 a	17,89 ± 1,66 e
San Andreas	2,08 ± 0,0283 b	1,69 ± 0,0266 a	18,69 ± 0,2565 c	18,24 ± 1,75 e

¹ Valores expressos como a média em mg de equivalente de ácido gálico por g de fruto fresco ± erro padrão.

² Valores expressos como a média em mg de equivalente de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo por 100 g de fruto fresco ± erro padrão. Letras diferentes significam diferença significativa (ANOVA, seguido por teste de Newman-Keuls; p < 0,05) quando observadas nas colunas.

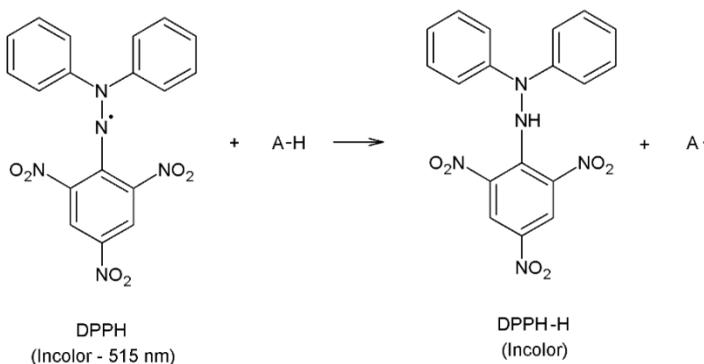
Já para as variações existentes entre os teores dos compostos analisados, cabe ressaltar que não apenas fatores genéticos estão envolvidos, mas também fatores como o grau de maturação do fruto e local de cultivo podem alterar a concentração dos compostos estudados. Josuttis et al. (2013) demonstraram a variação existente entre os teores de antocianinas totais, utilizando, como variável para comparação o local de cultivo. Os resultados mostraram que frutos de um mesmo cultivar, produzidos em diferentes países, biossintetizam diferentes concentrações de compostos antociânicos.

Os resultados demonstram a existência de ampla variação nos teores dos compostos fenólicos e antocianinas entre a maioria dos cultivares estudados, comprovando que as diferenças destes cultivares não se restringem apenas às características morfológicas e produtivas, mas também à concentração dos metabólitos secundários presentes nos frutos de morango. Sendo assim, o conhecimento dos teores de metabólitos secundários nos cultivares, especialmente as antocianinas, agregam valor ao fruto, devido à possibilidade de escolha de cultivares com alto teor de compostos bioativos para serem cultivados.

5.7 CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES (DPPH)

A capacidade de captação dos radicais livres foi realizada utilizando-se o radical DPPH. O processo consiste na redução do radical pelas substâncias presentes no extrato testado, levando a formação do DPPH-H reduzido, o qual altera sua coloração do violeta para o amarelo (Figura 21). Essa alteração de coloração é mensurada a partir da medida da absorbância por espectrofotometria.

Figura 21 – Esquema estrutural da neutralização do radical DPPH



Com o intuito de obter a concentração do extrato necessária para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH (EC_{50}), os extratos foram analisados em 200, 134, 67 e 33 $mg.mL^{-1}$ de fruto fresco, com monitoramento em 515 nm até que a redução da absorbância estabilizasse, o que foi obtido após 60 min. Posteriormente, os resultados, em absorbância, juntamente com as respectivas concentrações, foram plotadas em um gráfico, gerando, assim, uma equação da reta e, a partir daí, calculado o valor de EC_{50} em $mg.mL^{-1}$. Os dados expressos na tabela 10 demonstram os resultados de EC_{50} dos respectivos cultivares estudados, variando de 110 $mg.mL^{-1}$, para a cultivar Camino Real, que apresenta a menor capacidade de captar os radicais livres, até a Camarosa, a qual apresentou 76,73 $mg.mL^{-1}$ com a maior capacidade de captação dos radicais livres. Os cultivares Albion e Aromas não demonstraram diferença significativa entre os valores de EC_{50} , o mesmo ocorrendo entre os cultivares Portola e San Andreas; Monte Rey e Albion.

Tabela 10 – Valores médios de EC_{50} de extratos de frutos dos diferentes cultivares

Cultivares	EC_{50}^*
Albion	91,80 c
Aromas	88,98 cd
Camarosa	76,73 e
Camino Real	110,30 a
Monte Rey	84,33 d
Portola	101,91 b
San Andreas	103,44 b

*Dados expressos na média em $mg.mL^{-1}$

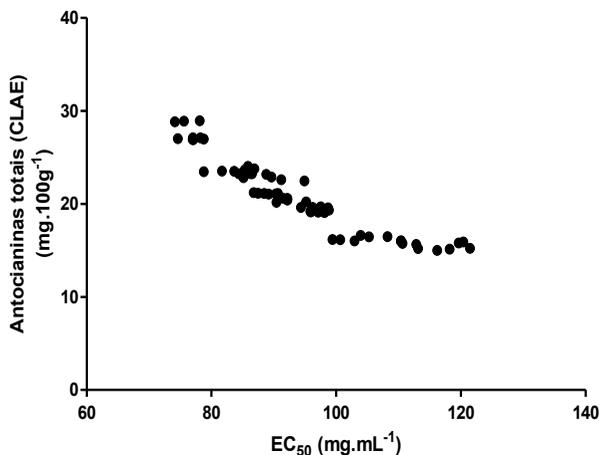
Letras diferentes significam diferença significativa (ANOVA, seguido por teste de Newman-Keuls; $p < 0,05$)

Os valores de EC_{50} foram plotados frente à quantificação por CLAE e pelo método do pH diferencial, e ambas demonstraram uma forte correlação com os teores de antocianinas totais. Essa correlação apresentou-se de forma negativa, ou seja, com o aumento da concentração das antocianinas totais ocorreu uma diminuição nos valores de EC_{50} , sendo o coeficiente de correlação da comparação com os resultados de CLAE igual a - 0,9374 (Figura 22) e, quando plotado com os teores resultantes do método do pH diferencial, obteve-se um coeficiente de correlação de - 0,7390.

Nossos resultados corroboram os dados de Giovanelli e Buratti (2009), que demonstraram a existência de forte correlação entre a

concentração de antocianinas em frutos de mirtilo e a capacidade de captação de radicais livres desta espécie.

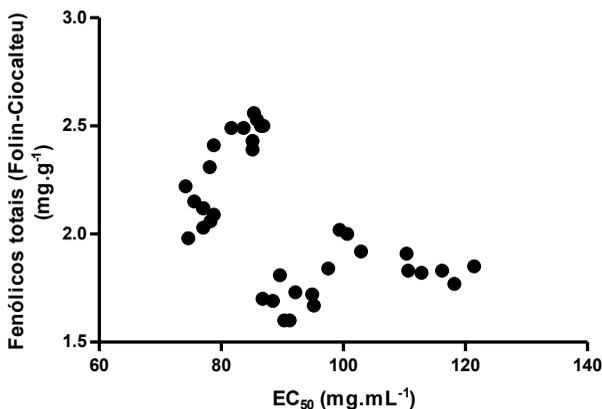
Figura 22 – Correlação de Pearson entre os teores de antocianinas totais (CLAE) e valores de EC_{50} dos extratos dos frutos dos 7 cultivares ($r = -0,9374$; $p < 0,0001$)



Os teores de fenólicos totais, quando correlacionados com os valores de EC_{50} , demonstram a existência de uma correlação relativamente fraca entre essas duas variáveis. Os resultados oriundos da técnica de Folin-Ciocalteu apresentaram coeficiente de correlação igual a $-0,4893$ (Figura 23), enquanto que, a partir dos teores de fenólicos totais obtidos pela técnica de Fast Blue BB, o coeficiente de correlação foi $-0,3933$.

A partir desses resultados, é possível sugerir que a capacidade de captação de radicais livres dos extratos avaliados seja mais influenciada pelos teores de antocianinas totais do que pelos teores de compostos fenólicos totais.

Figura 23 – Correlação de Pearson entre os teores de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e valores de EC_{50} dos extratos dos frutos dos 7 cultivares ($r = -0,4893$; $p < 0,05$)



A correlação existente entre as antocianinas e a capacidade de captação de radicais livres denota que os compostos antociânicos dos cultivares investigados possuem uma potencial atividade antioxidante, superior aos compostos fenólicos de forma geral. Essa peculiaridade das antocianinas provavelmente está relacionada à capacidade reativa que a molécula apresenta, devido ao fato de sua forma mais estável se apresentar como um cátion, a qual é capaz de oxidar-se facilmente. É importante ressaltar que a captação de radicais livres, aferida *in vitro* por meio do radical DPPH, trata-se de um ensaio preliminar que visa a realizar uma triagem, sendo necessárias mais investigações em modelos *ex-vivo* e *in vivo* para comprovar essa hipótese.

6 CONCLUSÕES

A padronização do processo extrativo indicou que as condições necessárias para a obtenção de um processo extrativo exaustivo foram: um período de 75 minutos de extração; relação entre a massa de fruto e volume de solução extratora de 1 g para 25 mL de uma solução metanólica com 1% HCl.

Quanto à quantificação dos compostos fenólicos realizada pela técnica de Folin-Ciocalteu, foi observado que o cultivar Monte Rey apresentou os maiores teores, enquanto os cultivares Aromas e Camino Real não demonstraram diferença significativa, fato também observado para os cultivares Albion e Portola, e também Camarosa e San Andreas.

A técnica de Fast Blue BB, tal como a de FC, confirmou que dentre os cultivares estudados, o cultivar Monte Rey apresentou os maiores teores de compostos fenólicos. Para os demais cultivares avaliados não apresentaram diferença significativa nos teores de fenólicos totais.

Comparando as técnicas Fast Blue BB e Folin-Ciocalteu, e apesar das diferenças existentes nos TFT obtidos, uma correlação positiva e forte foi detectada entre as respectivas técnicas.

Os teores de antocianinas totais quantificados pelos métodos do pH diferencial e CLAE, detectaram que os maiores teores de antocianinas detectados foram no cultivar Camarosa. Além disso, a metodologia do pH diferencial demonstrou que os cultivares Albion e Aromas apresentaram-se estatisticamente iguais, assim como Camino Real e Portola e ainda Monte Rey e San Andreas.

A técnica de quantificação por CLAE não demonstrou a existência de diferença significativa entre os cultivares Albion e Aromas, para teores de antocianinas totais, assim como entre os cultivares San Andreas e Portola.

Os teores de antocianinas totais obtidos pelas técnicas CLAE e pH diferencial apresentaram uma correlação positiva forte, ou seja, a proporção é mantida entre os resultados das duas técnicas, apesar da diferença absoluta entre os resultados.

Comparando os teores de antocianinas totais obtidos pelas técnicas CLAE e pH diferencial, é possível concluir que os cultivares Camino Real e San Andreas não apresentam diferença estatística significativa quanto aos teores de antocianinas totais.

A partir da quantificação realizada por CLAE foi possível concluir que a pelargonidina-3-O-glicosídeo apresentou-se como a antocianina majoritária, com teores superiores a 80% do teor de antocianinas totais.

A capacidade dos extratos dos frutos em sequestrar radicais livres, avaliada pelo radical DPPH, demonstrou que o cultivar Camarosa apresenta os menores valores de EC_{50} , ou seja, a maior capacidade de captar os radicais livres, dentre os cultivares estudados.

Uma correlação negativa forte foi observada entre os teores de antocianinas totais (CLAE) e os valores de EC_{50} do radical DPPH. Em contrapartida, a correlação entre o teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e os valores de EC_{50} do radical DPPH apresentou-se fraca.

REFERÊNCIAS

- AABY, K.; SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria x ananassa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4032-4040, 2005.
- AABY, K.; EKEBERG, D.; SKREDE, G. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 4395-4406, 2007.
- AABY, K.; MAZUR, S.; NES, A.; SKREDE, G. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 86-97, 2012.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; DEKANSKI, D.; RISTIĆ, S.; RADONJIĆ, N. V.; PETRONIJEVIĆ, N. D.; GIAMPIERI, F.; ASTOLFI, P.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; TULIPANI, S.; QUILES, J. L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. **Plos One**, v. 6, n. 10, 2011.
- AMARO, L. F.; SOARES, M. T.; PINHO, C.; ALMEIDA, I. F.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Processing and storage effects on anthocyanin composition and antioxidant activity of jams produced with Camarosa strawberry. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 10, p. 2071-2077, 2013.
- AMR, A.; AL-TAMIMI, E. Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 8, p. 985-991, 2007.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. USA: Taylor & Francis, 2006. ISBN 9781420039443.
- ANTUNES, L. E. C.; REISSER, C. J. CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MORANGOS NO BRASIL. **Fruticultura (Bologna)**, v. 69, p. p. 60-65, 2007.

ANTUNES, L. E. C.; PERES, N. A. Strawberry Production in Brazil and South America. **International Journal of Fruit Science**, v. 13, n. 1-2, p. 156-161, 2013.

ANTUNES, O. T.; CALVETE, E. O.; ROCHA, H. C.; NIENOW, A. A.; CECCHETTI, D.; RIVA, E.; MARAN, R. E. Produção de cultivares de morangueiro polinizadas pela abelha jataí em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 094-099, 2007.

AOAC. Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. **Association of Official Analytical Chemists International**, 2002.

BALKAU, B.; VALENSI, P.; ESCHWÈGE, E.; SLAMA, G. A review of the metabolic syndrome. **Diabetes and Metabolism**, v. 33, n. 6, p. 405-413, 2007.

BASU, A.; FU, D. X.; WILKINSON, M.; SIMMONS, B.; WU, M.; BETTS, N. M.; DU, M.; LYONS, T. J. Strawberries decrease atherosclerotic markers in subjects with metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v. 30, n. 7, p. 462-469, 2010.

BORDIGNON JR, C. L. **Análise química de cultivares de morango em diferentes sistemas de cultivo e época de colheita**. 2008. 132 (Dissertação de Mestrado). UPF - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo - RS.

BORDIGNON JR, C. L.; FRANCESCATTO, V.; NIENOW, A. A.; CALVETE, E.; REGINATTO, F. H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 183, 2009.

BORDONABA, J. G.; CRESPO, P.; TERRY, L. A. A new acetonitrile-free mobile phase for HPLC-DAD determination of individual anthocyanins in blackcurrant and strawberry fruits: A comparison and validation study. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1265-1273, 2011.

BORKOWSKI, T.; SZYMUSIAK, H.; GLISZCZYŃSKA-SWIGŁO, A.; TYRAKOWSKA, B. The effect of 3-O- β -glucosylation on structural transformations of anthocyanidins. **Food Research International**, v. 38, n. 8-9, p. 1031-1037, 2005.

BOULTON, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, n. 2, p. 67-87, 2001.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRIDLE, P.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Analysis of anthocyanins by capillary zone electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 19, n. 4, p. 537-545, 1996.

BRIDLE, P.; GARCIA-VIGUERA, C. Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. **Food Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 299-304, Jun 1997.

BROUILLARD, R.; DUBOIS, J.-E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 5, p. 1359-1364, 1977.

BRUNETON, J.; FRESNO, Á. M. V.; ACCAME, E. C.; LIZABE, M. R. **Farmacognosia: fitoquímica. Plantas medicinales**. Acribia, Editorial, S.A., 2001. ISBN 9788420009568.

BUENDIA, B.; GIL, M. I.; TUDELA, J. A.; GADY, A. L.; MEDINA, J. J.; SORIA, C.; LOPEZ, J. M.; TOMAS-BARBERAN, F. A. HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 3916-26, Apr 14 2010.

BUENO, J. M.; SÁEZ-PLAZA, P.; RAMOS-ESCUADERO, F.; JIMÉNEZ, A. M.; FETT, R.; ASUERO, A. G. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 126-151, 2012.

BURTON-FREEMAN, B.; LINARES, A.; HYSON, D.; KAPPAGODA, T. Strawberry modulates LDL oxidation and postprandial lipemia in response to high-fat meal in overweight hyperlipidemic men and women. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 46-54, 2010.

CALVETE, E. O.; MARIANI, F.; WESP, C. D. L.; NIENOW, A. A.; CASTILHOS, T.; CECCHETTI, D. Fenologia, produção e teor de antocianinas de cultivares de morangueiro em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 396-401, 2008.

CANTILLANO, R. F. F.; ÁVILA, J. M. M.; PERALBA, M. C. R.; PIZZOLATO, T. M.; TORALLES, R. P. Antioxidant activity, phenolic compounds and ascorbic acid content in strawberries from two crop production systems. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 620-626, 2012.

CARLTON, P. S.; KRESTY, L. A.; SIGLIN, J. C.; MORSE, M. A.; LU, J.; MORGAN, C.; STONER, G. D. Inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine-induced tumorigenesis in the rat esophagus by dietary freeze-dried strawberries. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 3, p. 441-446, 2001.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. O. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. cap. 20, p.519-535. ISBN 978-85-328-0395-5.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. D. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 499-509, 2011.

CEREZO, A. B.; CUEVAS, E.; WINTERHALTER, P.; GARCIA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 574-582, 2010.

CHUNG, M. J.; LEE, S. H.; SUNG, N. J. Inhibitory effect of whole strawberries, garlic juice or kale juice on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine in humans. **Cancer letters**, v. 182, n. 1, p. 1-10, 2002.

CLIFFORD, M. N. Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1063-1072, 2000.

COPETTI, C.; BORGES, G. S.; BARCELOS-OLIVEIRA, J. L.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; BERTOLDI, F. C. Antioxidant activity and productivity of different strawberry cultivars (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) produced in a hydroponic system. **Acta Horticulturae**, v. 947, p. 369-374, 2012.

CORRADINI, E.; FOGLIA, P.; GIANANTI, P.; GUBBIOTTI, R.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. **Natural Product Research**, v. 25, n. 5, p. 469-495, 2011.

DA COSTA, C. T.; NELSON, B. C.; MARGOLIS, S. A.; HORTON, D. Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 799, n. 1-2, p. 321-327, Mar 13 1998.

DA COSTA, C. T.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1, p. 403-410, 2000.

DA SILVA, F. L.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; PÉREZ ALONSO, J. J.; RIVAS-GONZALO, J. C.; SANTOS-BUELGA, C. Anthocyanin pigments in strawberry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 374-382, 2007.

DE PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocyanins: From plant to health. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 281-299, 2008.

DE SOUZA BARBOZA, J. C.; SERRA, A. A. Ultra-som (I): influência do ultra-som na química. **Química Nova**, v. 15, n. 4, p. 303, 1992.

DEL RIO, D.; BORGES, G.; CROZIER, A. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. **British Journal of Nutrition**, v. 104 Suppl 3, p. S67-90, Oct 2010.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818-1892, 2013.

DIAMANTI, J.; CAPOCASA, F.; DENOYES, B.; PETIT, A.; CHARTIER, P.; FAEDI, W.; MALTONI, M. L.; BATTINO, M.; MEZZETTI, B.

Standardized method for evaluation of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) germplasm collections as a genetic resource for fruit nutritional compounds. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, n. 2, p. 170-178, 2012.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, v. 365, n. 9468, p. 1415-1428, 2005.

ESCRIBANO-BAILON, M. T.; SANTOS-BUELGA, C. Anthocyanin Copigmentation - Evaluation, Mechanisms and Implications for the Colour of Red Wines. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 715-723, Mar 2012.

FAO. FAOSTAT: Agricultural Production/strawberry. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO**, n., p., Acessado em Dez - 2013, 2011. Disponível em: < <http://www.faostat.fao.org> >.

FLESCHHUT, J.; KRATZER, F.; RECHKEMMER, G.; KULLING, S. E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. **European Journal of Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 7-18, Feb 2006.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927.

FRANQUES, G. G. **Seleção e multiplicação de clones de morangueiro (*Fragaria* × *ananassa* Duch.)**. 2009. (Tese de Doutorado). UFSM, Santa Maria - RS.

GALVANO, F.; LA FAUCI, L.; LAZZARINO, G.; FOGLIANO, V.; RITIENI, A.; CIAPPELLANO, S.; BATTISTINI, N. C.; TAVAZZI, B.; GALVANO, G. Cyanidins: metabolism and biological properties. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 1, p. 2-11, 2004.

GARZON, G.; WROLSTAD, R. Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 4, p. 1288-1299, 2002.

GIAMPIERI, F.; TULIPANI, S.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; QUILES, J. L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 9-19, Jan 2012.

GIAMPIERI, F.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; MAZZONI, L.; ROMANDINI, S.; BOMPADRE, S.; DIAMANTI, J.; CAPOCASA, F.; MEZZETTI, B.; QUILES, J. L.; FERREIRO, M. S.; TULIPANI, S.; BATTINO, M. The potential impact of strawberry on human health. **Natural Product Research**, v. 27, n. 4-5, p. 448-455, 2013.

GIOVANELLI, G.; BURATTI, S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 903-908, 2009.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, 2001.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 163-87, 2010.

HERNANZ, D.; RECAMALES, Á. F.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; GONZÁLEZ-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**, v. 55, n. 5, p. 1846-1852, 2007.

HUANG, W. Y.; ZHANG, H. C.; LIU, W. X.; LI, C. Y. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 13, n. 2, p. 94-102, Feb 2012.

ICH - GUIDELINE, H. T. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1),(November 2005) International Conference on Harmonization. 2005.

JIN, P.; WANG, S. Y.; WANG, C. Y.; ZHENG, Y. Effect of cultural system and storage temperature on antioxidant capacity and phenolic compounds in strawberries. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 262-270, 2011.

JOSUTTIS, M.; VERRALL, S.; STEWART, D.; KRÜGER, E.; MCDOUGALL, G. J. Genetic and environmental effects on tannin composition in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) cultivars grown in different

European locations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 4, p. 790-800, 2013.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4076-4082, 2001.

KAJZANOSKA, M.; PETRESKA, J.; STEFOVA, M. Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5272-8, May 25 2011.

KAUR, S.; DAS, M. Functional foods: An overview. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 861-875, 2011.

KELEBEK, H.; SELLI, S. Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry Fruits by Rp-Hplc-Dad and Investigation of Their Antioxidant Capacity. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 34, n. 20, p. 2495-2504, 2011.

KHAN, M. I.; ANJUM, F. M.; SOHAIB, M.; SAMEEN, A. Tackling metabolic syndrome by functional foods. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 14, n. 3, p. 287-297, 2013.

KONCZAK, I.; ZHANG, W. Anthocyanins-more than nature's colours. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 5, n. 2004, p. 239-240, 2004.

KONCZAK, I.; TERAHARA, N.; YOSHIMOTO, M.; NAKATANI, M.; YOSHINAGA, M.; YAMAKAWA, O. Regulating the composition of anthocyanins and phenolic acids in a sweetpotato cell culture towards production of polyphenolic complex with enhanced physiological activity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 9, p. 377-388, 2005.

KONG, J. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.

KOSAR, M.; KAFKAS, E.; PAYDAS, S.; BASER, K. H. C. Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1586-1589, 2004.

LAL, S.; AHMED, N.; SINGH, S. R.; SINGH, D. B.; SHARMA, O. C.; KUMAR, R. Variability of health and bioactive compounds in strawberry

(*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars grown under an Indian temperate ecosystem. **Fruits**, v. 68, n. 5, p. 423-434, 2013.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, Sep-Oct 2005.

LEE, J.; RENNAKER, C.; WROLSTAD, R. E. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 782-786, 2008.

LESTER, G. E.; LEWERS, K. S.; MEDINA, M. B.; SAFTNER, R. A. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin-Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, n. 1, p. 102-107, 2012.

LI, W.; HYDAMAKA, A. W.; LOWRY, L.; BETA, T. Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. **Central European Journal of Biology**, v. 4, n. 4, p. 499-506, 2009.

LUKTON, A.; CHICHESTER, C.; MACKINNEY, G. Characterization of a second pigment in strawberries. **Nature**, v. 176, p. 790, 1955.

MEDINA, M. B. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1565-1571, 2011a.

MEDINA, M. B. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 2, p. 79-87, 2011b.

MEYERS, K. J.; WATKINS, C. B.; PRITTS, M. P.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6887-6892, 2003.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, Oct 29 2004.

NORCALNURSERY. Strawberry Cultivars. USA, 2013. Disponível em: <<http://norcalnursery.com/strawberry-varieties/>>. Acesso em: 15/11/2013.

ODRIOZOLA-SERRANO, I.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. Influence of storage temperature on the kinetics of the changes in anthocyanins, vitamin C, and antioxidant capacity in fresh-cut strawberries stored under high-oxygen atmospheres. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 2, p. C184-91, Mar 2009.

ORNELAS-PAZ, J.; YAHIA, E. M.; RAMIREZ-BUSTAMANTE, N.; PEREZ-MARTINEZ, J. D.; ESCALANTE-MINAKATA MDEL, P.; IBARRA-JUNQUERA, V.; ACOSTA-MUNIZ, C.; GUERRERO-PRIETO, V.; OCHOA-REYES, E. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 372-81, May 1 2013.

OTTO, R. F.; MORAKAMI, R. K.; REGHIN, M. Y.; CAÍRES, E. F. Cultivares de morango de dia neutro: produção em função de doses de nitrogênio durante o verão. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 217-221, 2009.

PADULA, M. C.; LEPORE, L.; MILELLA, L.; OVESNA, J.; MALAFRONTTE, N.; MARTELLI, G.; DE TOMMASI, N. Cultivar based selection and genetic analysis of strawberry fruits with high levels of health promoting compounds. **Food Chemistry**, v. 140, n. 4, p. 639-646, 2013.

PAL, D.; DUBEY, P. Flavonoids: A powerful and abundant source of antioxidants. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 95-98, 2013.

PALHA, M. G. A planta do morangueiro. In: PALHA, M. G. (Ed.). **Manual do Morangueiro**. Portugal: Belgráfica, 2005. p.3-11.

PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; ANDRADE, P. B. Phenolics: From Chemistry to Biology. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2202-2211, 2009.

PINELI, L. D. L.; MORETTI, C. L.; RODRIGUES, J. S.; FERREIRA, D. B.; CHIARELLO, M. D. Variations in antioxidant properties of strawberries grown in Brazilian savannah and harvested in different seasons. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 4, p. 831-838, 2012.

PINELI, L. D. L. D. O.; MORETTI, C. L.; DOS SANTOS, M. S.; CAMPOS, A. B.; BRASILEIRO, A. V.; CORDOVA, A. C.; CHIARELLO, M. D. Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two

strawberry cultivars at different ripeness stages. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 1, p. 11-16, 2011.

RADIN, B.; LISBOA, B. B.; WITTER, S.; BARNI, V.; REISSER JÚNIOR, C.; MATZENAUER, R.; FERMINO, M. H. Performance of four strawberry cultivars in two ecoclimatic regions of Rio Grande do Sul State, Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 287-291, 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7a. ed. Rio de Janeiro: 2007.

REIN, M. J.; HEINONEN, M. Stability and enhancement of berry juice color. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 3106-3114, 2004.

REVILLA, E.; RYAN, J.-M.; MARTÍN-ORTEGA, G. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4592-4597, 1998.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; FREITAS, A. C.; DUARTE, A. C.; GOMES, A. M. P. Analytical strategies for characterization and validation of functional dairy foods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 41, p. 27-45, 2012.

RUBINSKIENE, M.; VISKELIS, P.; JASUTIENE, I.; VISKELIENE, R.; BOBINAS, C. Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. **Food Research International**, v. 38, n. 8-9, p. 867-871, 2005.

SAITO, N.; TATSUZAWA, F.; MIYOSHI, K.; SHIGIHARA, A.; HONDA, T. The first isolation of C-glycosylanthocyanin from the flowers of *Tricyrtis formosana*. **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 36, p. 6821-6823, 2003.

SAMYKANNO, K.; PANG, E.; MARRIOTT, P. J. Chemical characterisation of two Australian-grown strawberry varieties by using comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1997-2005, Dec 1 2013.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SANHUEZA, R.; HOFFMANN, A.; ANTUNES, L.; FREIRE, J. D. M. Sistema de produção de morango para mesa na região da serra gaúcha e encosta superior do Nordeste. **Sistemas de produção**, 6, n., p., 2005. Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br/> >.

SCHWENGBER, J. E.; SCHIEDECK, G. Sistema orgânico de produção de morangos. **Embrapa Clima Temperado**, 2008.

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

SIMIRGIOTIS, M. J.; THEODULOZ, 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**, v. 113, n. 2, p. 377-385, 2009.

SINGH, A.; SINGH, B. K.; DEKA, B. C.; SANWAL, S. K.; PATEL, R. K.; VERMA, M. R. The genetic variability, inheritance and inter-relationships of ascorbic acid, β -carotene, phenol and anthocyanin content in strawberry (*Fragaria*×*ananassa* Duch.). **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 1, p. 86-90, 2011.

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

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, 2007.

STARR, M.; FRANCIS, F. Effect of metallic ions on color and pigment content of cranberry juice cocktail. **Journal of Food Science**, v. 38, n. 6, p. 1043-1046, 1973.

STONER, G. D.; KRESTY, L. A.; CARLTON, P. S.; SIGLIN, J. C.; MORSE, M. A. Isothiocyanates and freeze-dried strawberries as inhibitors of

esophageal cancer. **Toxicological Sciences**, v. 52, n. 2 SUPPL., p. 95-100, 1999.

STRASSBURGER, A. S.; PEIL, R. M. N.; SCHWENGBER, J. E.; MEDEIROS, C. A. B.; MARTINS, D. D. S.; SILVA, J. B. E. Crescimento e produtividade de cultivares de morangueiro de “dia neutro” em diferentes densidades de plantio em sistema de cultivo orgânico. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 623-630, 2010.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 733-49, May 2008.

TEIXEIRA, C. P. **Produção de mudas e frutos de morangueiro em diferentes sistemas de cultivo**. 2011. 74 (Doutor). Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

TERAHARA, N.; SAITO, N.; HONDA, T.; TOKI, K.; OSAJIMA, Y. Structure of ternatin A1, the largest ternatin in the major blue anthocyanins from *Clitoria ternatea* flowers. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 20, p. 2921-2924, 1990.

TIMM, L. C.; TAVARES, V. E. Q.; REISSER, C.; ESTRELA, C. C. **Morangueiro irrigado: aspectos técnicos e ambientais do cultivo**. Ed. da Universidade Federal de Pelotas, 2009.

UGOLINI, L.; MARTINI, C.; LAZZERI, L.; D'AVINO, L.; MARI, M. Control of postharvest grey mould (*Botrytis cinerea* Per.: Fr.) on strawberries by glucosinolate-derived allyl-isothiocyanate treatments. **Postharvest Biology and Technology**, v. 90, p. 34-39, 2014.

VALLS, J.; MILLAN, S.; MARTI, M. P.; BORRAS, E.; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 43, p. 7143-72, Oct 23 2009.

WANG, S. Y.; ZHENG, W.; GALLETTA, G. J. Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6534-6542, 2002.

WANG, S. Y.; MILLNER, P. Effect of different cultural systems on antioxidant capacity, phenolic content, and fruit quality of strawberries

(*Fragaria x ananassa* Duch.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9651-7, Oct 28 2009.

WICKLUND, T.; ROSENFELD, H. J.; MARTINSEN, B. K.; SUNDFØR, M. W.; LEA, P.; BRUUN, T.; BLOMHOFF, R.; HAFFNER, K. Antioxidant capacity and colour of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 4, p. 387-391, 2005.

WOJDYŁO, A.; OSZMIAŃSKI, J.; BOBER, I. The effect of addition of chokeberry, flowering quince fruits and rhubarb juice to strawberry jams on their polyphenol content, antioxidant activity and colour. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 4, p. 1043-1051, 2008.

WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 9, p. 423-428, 2005.

YILDIZ, Ö.; EYDURAN, S. P. Functional components of berry fruits and their usage in food technologies. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 5, p. 422-426, 2009.

ZHANG, Y.; SEERAM, N. P.; LEE, R.; FENG, L.; HEBER, D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 670-675, 2008.

ZOU, T.; WANG, D.; GUO, H.; ZHU, Y.; LUO, X.; LIU, F.; LING, W. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from mulberry and identification of anthocyanins in extract using HPLC-ESI-MS. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. C46-50, Jan 2012.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. O. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: Editor da UFSC, 2010. cap. 23, p.577-614. ISBN 978-85-328-0395-5.