

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
DOS ALIMENTOS**

***Gaylussacia brasiliensis* (Spreng) Meisn. (Ericaceae):
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DO FRUTO *IN VITRO* E *IN VIVO***

ADRIANA BRAMORSKI

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.
Orientadora: Profa. Dra. Roseane Fett

**Florianópolis
2011**

**Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina**

B815g Bramorski, Adriana
Gaylussacia brasiliensis (Spreng) Meisn. (Ericaceae)
[tese] : caracterização química e atividade biológica do fruto
in vitro e in vivo Adriana Bramorski ; orientadora, Roseane
Fett. - Florianópolis, SC, 2011.
147 p.: il., graf., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos alimentos. 2. Gaylussacia brasiliensis
- Palhoça (SC). 3. Composição. 4. Inibidores químicos. 5.
Hepatotoxicidade. I. Fett, Roseane. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. III. Título.

CDU 663/664

***Gaylussacia brasiliensis* (Spreng) Meisn. (Ericaceae):
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DO FRUTO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Por

Adriana Bramorski

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina, pela banca examinadora

Presidente:

Profa. Dra. Roseane Fett (UFSC) (Orientadora)

Membro:

Prof. Dr. Jorge Mancini Filho (USP)

Membro:

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho (UNIVALI)

Membro:

Profa. Dra. Tatiana Mezdri (UNIVALI)

Membro:

Profa. Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz
(UFSC)

Coordenadora:

Prof. Dra Roseane Fett (UFSC)
Florianópolis, julho de 2011.

*Dedico aos meus queridos pais
(in memorium)*

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para realização deste trabalho, meu sincero reconhecimento e agradecimento, em especial:

Ao meu companheiro Márcio Vieira Angelo pela sua contribuição na revisão da tese, além do incentivo e apoio incondicional durante o processo

Aos meus queridos irmãos e familiares pelo carinho, incentivo e apoio.

À Professora Dra. Roseane Fett, orientadora deste trabalho, que me acompanha desde a graduação, pela confiança, orientação, apoio e carinho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e ao Programa da Pós-Graduação que possibilitaram a minha formação desde a graduação até o doutorado

As coordenações e aos professores do Programa de Pós-Graduação por contribuir com qualidade para meu aprendizado

À Universidade do Vale do Itajaí que permitiu a utilização sem restrições de todos os espaços destinados a pesquisa.

Aos membros da Banca de Qualificação pelas contribuições num momento fundamental do caminho

Ao professor Dr. Jorge Mancini Filho pela sua contribuição como relator e membro da banca;

Ao professor Dr. Valdir Cechinel Filho pelo apoio e aceite em participar como membro da banca de defesa

À professora Dra. Tatiana Mezadri por suas contribuições, apoio e amizade durante o desenvolvimento do trabalho e aceite em participar da banca de defesa;

À professora Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz por suas contribuições e aceite em participar da banca de defesa;

À professora Dra. Sandra Soares Melo pela parceria e contribuições no decorrer do desenvolvimento do trabalho;

Ao secretário da Pós-Graduação, Sérgio de Souza, pela atenção nas relações administrativas;

Ao técnico Luciano Gonzaga pelo apoio e colaboração no decorrer do desenvolvimento do trabalho;

Ao meu amigo Ismael Ivan Rockenbach que sempre esteve presente na execução e discussão dos trabalhos realizados;

Ao Dr. Eliseo Soprano e ao Msc. Antônio Amaury Silva Junior da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI/SC), Estação Experimental de Itajaí pela indicação do fruto, objeto deste estudo;

A minha querida amiga Andrea da Costa pelo seu incentivo e apoio;

Ao coletador Mário e sua família que prontamente realizavam a coleta do fruto.

Muito Obrigada.

BRAMORSKI, A. *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng) Meisn. (Ericaceae): caracterização química e atividade biológica do fruto *in vitro* e *in vivo*. 2011. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

A fruticultura brasileira tem grande potencial de expansão pela diversidade de espécies nativas e exóticas insuficientemente estudadas quanto às suas propriedades nutricionais e funcionais, dentre elas, a *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng) Meissner var. *brasiliensis*, pertencente à família Ericaceae, popularmente conhecida como camarinha. No presente estudo objetivou-se caracterizar a composição química, identificar compostos bioativos, avaliar a estabilidade do fruto e produtos derivados em armazenamento a baixas temperaturas (5^oC e -15^oC) e o efeito do suco do fruto da *G. brasiliensis* (*camarinha*) sobre a peroxidação lipídica e atividade antioxidante das enzimas contra o dano hepático em ratos. As amostras do fruto da *G. brasiliensis* foram coletadas na Praia do Sonho, município de Palhoça, litoral sul de Santa Catarina, Brasil. Determinou-se a composição centesimal, o perfil de minerais e ácidos graxos, o conteúdo de polifenóis totais e a atividade antioxidante utilizando diferentes métodos (DPPH[•], ABTS, FRAP) e diferentes solventes extratores (acetona, metanol, álcool, água). Na avaliação *in vivo* 36 ratos machos *wistar* foram divididos em seis grupos: três controles (padrão, agente estressor e suplementação com camarinha); e três grupos de exposição suplementados com suco de camarinha antes e/ou após administração do agente estressor (metil metano sulfonato-MMS). Após 30 dias de tratamento todos os animais foram sacrificados e amostras do sangue e do fígado foram coletadas para avaliar a atividade das enzimas aminotransferases (ALT, AST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidação lipídica e o perfil histológico do fígado. O fruto apresentou a seguinte composição: umidade (81,30%), lipídios (0,62%), proteínas (0,56%), carboidratos (10,74%), fibras alimentares (6,53%), cinzas (0,25%). Em sua composição mineral, K, Mg, Ca e Fe foram os que apresentaram as maiores

concentrações. A fração lipídica caracterizou-se pelo alto conteúdo de ácidos graxos insaturados (78,70%), com predominância dos ácidos graxos polinsaturados (62,2%). O fruto da *G. brasiliensis* apresentou conteúdos elevados de compostos fenólicos (492,87 mg EAG/100g) e de antocianinas (240,43 mg cy-3-glu/100g) que contribuíram para a sua alta atividade antioxidante. Observou-se correlação positiva entre o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante, tendo sido a acetona e o metanol os solventes mais eficientes para extração de seus polifenóis. O congelamento (-15⁰C) quando comparado a refrigeração (5⁰C) mostrou-se como o método mais eficiente para a estabilidade dos compostos fenólicos e antocianinas do fruto da *G. brasiliensis* e produtos derivados. A administração MMS aumentou os níveis séricos de AST ALT, SOD, CAT (p <0.05) em ratos alimentados com dieta basal. Quando administrado o suco de camarinha a atividade destas enzimas foram praticamente restauradas e alcançaram valores próximos ao grupo controle. A avaliação histopatológica mostrou que os grupos expostos ao agente estressor (MMS) e suplementados com o suco do fruto da *G. brasiliensis* apresentaram arquitetura normal indicando efeito protetor deste fruto. Os resultados indicam que o suco do fruto da *G. brasiliensis* poderia minimizar o estresse hepático pela inibição hepática do acúmulo lipídico e redução do dano oxidativo. Este estudo aponta o potencial deste fruto como importante fonte de compostos nutricionais e bioativos.

Palavras-chave: *Gaylussacia brasiliensis*, composição química, atividade antioxidante, hepatotoxicidade

BRAMORSKI, A. *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng) Meisn. (Ericaceae): chemical characterization and *in vitro* and *in vivo* biological activity of the fruit. 2011.

ABSTRACT

Fruit production in Brazil has a high potential for expansion given the diversity of native and exotic species which have not been sufficiently studied with regard to their nutritional and functional properties. One such example is *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng) Meissner var. *brasiliensis*, belonging to the Ericaceae family, commonly known as *camarinha*. The aims of this study were to characterize the chemical composition, identify bioactive compounds, evaluate the stability of the fruit and derived products under storage at low temperatures (5°C and -15°C) and investigate the effect of *G. brasiliensis* fruit juice on the lipid peroxidation and antioxidant activity of enzymes against hepatic damage in rats. The samples of *G. brasiliensis* fruit were collected at Praia do Sonho, in the municipality of Palhoça, on the coast of Santa Catarina state, southern Brazil. The centesimal composition, mineral and fatty acids profile, total polyphenol content and antioxidant activity were determined using different methods (DPPH[•], ABTS, and FRAP) and different extractor solvents (acetone, methanol, alcohol, and water). In the *in vivo* evaluation, 36 male Wistar rats were divided into six groups: three controls (standard, stressor agent and supplementation with *camarinha*); and three exposure groups supplemented with *camarinha* juice before and/or after the administration of the stressor agent (methyl methanesulfonate - MMS). After 30 days of treatment all of the animals were sacrificed and blood and liver samples were collected in order to evaluate the activity of the enzymes aminotransferase (ALT, AST), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD), as well as the lipid peroxidation and the histological profile of the liver. The fruit had the following composition: moisture (81.30%), carbohydrates (10.74%), dietary fiber (6.53%), lipids (0.62%), proteins (0.56%), and ash content (0.25%). In its mineral composition K, Mg, Ca and Fe showed the highest concentrations. The lipid fraction was characterized by a high

content of unsaturated fatty acids (78.70%), with a predominance of polyunsaturated (62.2%). The fruit of *G. brasiliensis* had high contents of phenolic compounds (492.87 mg GAE/100g) and of anthocyanins (240.43 mg cy-3-glu/100g), which contributed to the high antioxidant activity. A positive correlation between the phenolic compounds content and antioxidant activity was observed, with acetone and methanol being the most efficient solvents for the extraction of polyphenols. Freezing (-15°C) when compared with refrigeration (5°C) was found to be more efficient in terms of the stability of the phenolic compounds and anthocyanins of the *G. brasiliensis* fruit and derived products. The administration of MMS increased the serum levels of AST/ALT, SOD, and CAT ($p < 0.05$) in rats fed on a basal diet. When the *camarinha* juice was administered, the activity of these enzymes were almost restored and reached values close to the group control. The histopathological evaluation showed that the groups exposed to the stressor agent (MMS) and supplemented with the *G. brasiliensis* fruit juice had normal architecture, indicating a protector effect of this fruit. The results demonstrate that *G. brasiliensis* fruit juice can minimize hepatic stress through the hepatic inhibition of lipid accumulation and a reduction in oxidative damage. This study highlights the potential of this fruit as an important source of nutritional and bioactive compounds.

Keywords: *Gaylussacia brasiliensis*, chemical composition, antioxidant activity, hepatotoxicity

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** *Gaylussacia brasiliensis* (A) período de floração; (B) formação dos frutos, Palhoça, SC, 2008 19
- Figura 2.** *Gaylussacia brasiliensis* (C) fruto na fase madura; (D) fruto fase de colheita, Palhoça, SC, 2008 20
- Figura 3.** Biossíntese da glutathiona e enzimas envolvidas 25
- Figura 4.** Estrutura das principais classes de flavonóides 27

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Atividade das enzimas (A) aspartato transaminase (AST) e (B) alanina transaminase (ALT) no plasma de ratos 68
- Figura 2.** Atividade das enzimas antioxidantes (A) SOD e (B) CAT no plasma de ratos 69
- Figura 3.** Peroxidação lipídica no fígado dos ratos 70
- Figura 4.** Fotomicrografia da seção do fígado dos ratos após vários tratamentos 71

CAPÍTULO 4

- Figura 1.** Correlação entre as concentrações de fenólicos e antocianinas do fruto da *G. brasiliensis* e produtos derivados durante o período de armazenamento a 5⁰C e -15⁰C 82

Figura 2.	Retas ajustadas e intervalos de confiança para as concentrações de antocianinas do fruto da <i>G. brasiliensis</i> e derivados a 5 ⁰ C	84
Figura 3.	Percentual de retenção do conteúdo de antocianinas do fruto <i>G. brasiliensis</i> e produtos durante o armazenamento a 5°C	84
Figura 4	Retas ajustadas e intervalos de confiança para as concentrações de fenólicos totais do fruto da <i>G. brasiliensis</i> e derivados a 5 ⁰ C	86
Figura 5.	Retas ajustadas e intervalos de confiança para as concentrações de antocianinas (A) e fenólicos (B) do fruto da <i>G. brasiliensis</i> e derivados a 5 ⁰ C	87
Figura 6.	Percentual de retenção do conteúdo de fenólicos totais do fruto <i>G. brasiliensis</i> e produtos durante o armazenamento a 5°C	87
Figura 7.	Retas ajustadas e intervalos de confiança para as concentrações de antocianinas totais do fruto da <i>G. brasiliensis</i> e derivados a -15 ⁰ C	88
Figura 8.	Retenção do conteúdo de antocianinas totais do fruto da <i>G. brasiliensis</i> e produtos durante o armazenamento a -15 ⁰ C	89
Figura 9.	Retas ajustadas e intervalos de confiança para as concentrações de fenólicos totais do fruto da <i>G. brasiliensis</i> e derivados a -15 ⁰ C	90
Figura 10.	Retenção do conteúdo de fenólicos totais do fruto da <i>G. brasiliensis</i> e produtos durante o armazenamento a -15 ⁰ C	91

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Composição centesimal (g/100 g) do fruto da <i>Gaylussacia brasiliensis</i>	48
Tabela 2.	Composição mineral (mg/100g) do fruto da <i>Gaylussacia brasiliensis</i>	49
Tabela 3.	Perfil de ácidos graxos (g/100 g) do fruto da <i>Gaylussacia brasiliensis</i>	50
Tabela 4.	Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos do fruto da <i>Gaylussacia brasiliensis</i> (camarinha)	51

CAPÍTULO 3

Tabela 1.	Efeito dos diferentes tratamentos sobre o consumo alimentar relativizado, ganho peso e peso do fígado relativizado após tratamento, colesterol e glicose	66
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AGP	Ácido Graxo Poliinsaturado
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CEPSH	Comitê de Ética para Pesquisas com Seres Humanos
COX	Cicloxigenase
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
GAE	Equivalente Ácido Gálico
EPAGRI/SC	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Potencial Antioxidante de Redução do Ferro
FT	Fenólicos Totais
GSH-Px	Glutathiona Peroxidase
GR	Glutathiona Redutase
GSH	Glutathiona Reduzida
GST	Glutathiona S-Transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HOO [·]	Radical Hidroperoxil
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
MMS	Metil metanosulfonato
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGE ₂	Prostaglandinas
RL	Radical Livre
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEAC
UFSC
μL

Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox
Universidade Federal de Santa Catarina
Microlitros

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.1 <i>Gaylussacia brasiliensis</i>	23
1.2 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	25
1.3 Mecanismos de defesa antioxidantes	28
1.4 Extração, quantificação e identificação de compostos fenólicos	34
1.5 Avaliação da capacidade antioxidante	37
REFERÊNCIA	40
CAPÍTULO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO FRUTO DA <i>GAYLUSSACIA BRASILIENSIS</i> (CAMARINHA) NATIVA NO BRASIL	55
Resumo	56
Abstract	57
1 Introdução	58
2 Material e Métodos	58
2.1 Amostra	58
2.2 Reagentes	59
2.3 Métodos	59
2.3.1 Composição centesimal	59
2.3.2 Composição mineral	60
2.3.3 Determinação do perfil de ácidos graxos	60
2.3.4 Preparação do extrato	60
2.3.5 Determinação dos fenólicos totais (FT)	61
2.3.6 Determinação de antocianinas monoméricas totais	61
2.3.7 Avaliação da Atividade Antioxidante	62
2.3.8 Análise Estatística	63
3 Resultados e Discussão	63
3.1 Composição Química	63

3.2 Perfil de ácidos graxos	66
3.3 Compostos fenólicos totais (FT)	67
3.4 Conteúdo de antocianinas monoméricas totais (AMT)	68
3.5 Atividade Antioxidante	69
4 Conclusão	70
Agradecimentos	70
Referências	70

CAPÍTULO 3 – EFEITO DO SUCO DA GAYLUSSACIA BRASILIENSIS SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS ENZIMAS CONTRA O DANO HEPÁTICO EM RATOS	75
Resumo	76
Abstract	77
1 Introdução	77
2.1 Amostra	78
2.2 Preparo da amostra	79
2.4 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas do suco	80
2.5 Animais	80
2.6 Tratamento	81
2.7 Análises bioquímicas	82
2.8 Análise do estresse oxidativo no fígado	82
2.9 Avaliação histológica	83
2.10 Análise estatística	83
3 Resultados	83
3.1 Perfil dos animais	83
3.2 Análises bioquímicas	83
3.3 Avaliação histológica do fígado	85
4 Discussão	72
5 Conclusão	73
Referências	72

CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO CONTEÚDO DE POLIFENÓIS TOTAIS E ANTOCIANINAS DO FRUTO DA <i>GAYLUSSACIA BRASILIENSIS</i> E PRODUTOS DERIVADOS DURANTE O ARMAZENAMENTO EM TEMPERATURAS BAIXAS	95
Resumo	96
Abstract..	97
1 Introdução	98
2 Material e Métodos	99
2.1 Amostra	99
2.1.1 Preparo da amostra	100
2.1.2 Extração da amostra	100
2.1.3 Período de análise	100
2.2 Reagentes	100
2.3 Metodologia	101
2.3.1 Determinação do conteúdo de fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais	101
2.4 Análise Estatística	101
3 Resultados e Discussão	101
3.1 Conteúdo de antocianinas monoméricas totais e polifenóis totais a 5°C	102
3.2 Mudanças do conteúdo de antocianinas monoméricas totais e fenólicos totais a - 15°C	107
4 Conclusão	112
Referências	112
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	 118
 ANEXOS	 115
ANEXO A – Pôster comentado no XXI Congresso Brasileiro de Nutrição, I Congresso Ibero-Americano de Nutrição, I Simpósio Latino-Americano de Nutrição Esportista – COBRAN 2010.	

ANEXO B - Artigo completo publicado. “Chemical composition and antioxidant activity of <i>Gaylussacia brasiliensis</i> (camarinha)” grown in Brazil. Food Research International (2010), doi:10.1016/j.foodres.2010.09.033	100
ANEXO C - Comprovante de submissão e submetido para apreciação pela revista <i>Basic of Clinical Pharmacology and Toxicology</i>	102
ANEXO D - Parecer de aprovação da Comissão de Ética e Pesquisa da Univali para uso de animais	104

INTRODUÇÃO

A importância da nutrição na promoção da saúde e prevenção de doenças tem impulsionado a ciência na busca de alimentos capazes de contribuir para a intervenção nesses processos. Estudos epidemiológicos têm demonstrado associação inversa entre o consumo de frutas e hortaliças e a morbi-mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis (HERTOG; HOLLMAN; VAN DE PUTTE, 1993; HOLLMAN; HERTO; KATAN, 1996; SILALAH, 2002; LIU et al., 2009). Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicaram que o baixo consumo de hortaliças e frutas apresenta-se entre os cinco principais fatores de risco para a carga global de doença e que muitas mortes no mundo estão relacionadas a inadequada dieta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Estes dados reforçam a hipótese de que o consumo regular de tais alimentos em quantidades adequadas na dieta da população poderia reduzir substancialmente as doenças que ocupam os primeiros lugares de mortalidade na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (MACHADO; SIMÕES, 2008).

As frutas, alimentos de reconhecido valor nutricional, possuem, via de regra, baixo teor calórico e são fontes importantes de vitaminas, minerais e fibras (HARBONE et al., 2000; SILALAH, 2002; DINI; TENORE; DINI, 2008). Além disto, apresentam em sua composição substâncias não tradicionalmente classificadas como nutrientes, mas que atualmente vem sendo pesquisadas quanto a sua capacidade de intermediar importantes funções bioquímicas da fisiologia humana (ESPIN; GARCIA-CONESA; TOMÁS-BARBERA, 2007; D'ARCHIVIO et al., 2007). Muitas frutas são particularmente fontes ricas de antioxidantes. Estes compostos são representados principalmete pela vitamina C e polifenóis tais como antocianinas, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, têm merecido especial atenção da comunidade científica por sua capacidade de atuar como redutores de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas reações de oxidação de lípídeos, proteínas e ácidos nucléicos (LEONG; SHUI, 2002, KUKOSKI et al., 2005; ALONTHAMAN; BHAT; KARIM, 2009). Essas características em sua composição justificam o crescente interesse de um grande número de pesquisadores a identificarem e estudarem novas espécies frutíferas.

No mercado mundial, a fruticultura vem se destacando como uma das atividades que apresentam maior retorno econômico e social (FREITAS et al., 2008). No entanto, a fruticultura brasileira tem ainda grande potencial de expansão, pois há inúmeras frutas nativas e exóticas insuficientemente exploradas economicamente (LAGO et al., 2006).

A *Gaylussacia brasiliensis*¹ conhecida na região Sul do Brasil como “*camarinha*”, é uma das espécies nativas brasileiras pouco conhecidas e não cultivadas, porém endêmica das restingas brasileiras, distribuídas principalmente entre os estados do Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás (LORENZI et al., 2006). Por ser um fruto ainda não estudado, apresentar aparência e sabor agradáveis, ser comestível e mostrar cor e sabor indicativos da presença compostos fenólicos, apresentou-se como boa opção de pesquisa para caracterização e avaliação de sua composição química e a presença de princípios ativos.

Este trabalho está apresentado na forma de capítulos, divididos nas seguintes abordagens:

Capítulo 1: Revisão bibliográfica.

Neste capítulo foi realizada a revisão dos temas relevantes que embasaram a realização deste estudo.

Capítulo 2: Composição química e atividade antioxidante *in vitro* do fruto da *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha) nativa no Brasil.

Neste capítulo foi analisada a composição centesimal e mineral, perfil de ácidos graxos da fração lipídica, conteúdo de polifenóis, antocianinas e a atividade antioxidante do fruto da *G. brasiliensis* utilizando diferentes extratores.

Capítulo 3: Efeito do suco da *Gaylussacia brasiliensis* sobre a peroxidação lipídica e atividade antioxidante das enzimas contra o dano hepático em ratos.

Neste capítulo foi avaliado o efeito das dietas suplementadas com o suco do fruto da *G. brasiliensis* (camarinha) isolado ou em combinação com o metil metanosulfonado sobre a peroxidação lipídica e atividade antioxidante de enzimas contra o dano hepático em ratos *Wistar*.

¹ Ericaceae, *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng) Meissner var. *brasiliensis*

Capítulo 4: Estabilidade do conteúdo de polifenóis totais e antocianinas do fruto da *G. brasiliensis* e produtos derivados durante o armazenamento em temperaturas baixas.

Neste capítulo foi avaliada a estabilidade do conteúdo de polifenóis totais e antocianinas do fruto da *G. brasiliensis* e seus produtos (polpa, suco) armazenados em temperatura de refrigeração (5⁰C) durante 30 dias e congelamento (-15⁰C) durante 360 dias.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Gaylussacia brasiliensis*

Espécie pertencente à família Ericaceae, botanicamente classificada como *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng) Meissner var. *brasiliensis*, conhecida popularmente no sul do país como “camarinha”. É uma frutífera não cultivada, endêmica das restingas brasileiras, distribuídas principalmente entre os estados do Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso e Goiás (SILVA; CERVI, 2006). No litoral sul integra a vegetação das praias e dunas, sob a influência marinha e fluvi-marinha (LORENZI et al., 2006).

É um arbusto de 0,3-4,0 m de altura, de ramos densamente folhosos, pilosos a glabros, geralmente com glândulas clavadas diminutas produzidos durante todo o ano (Fig. 1). Apresentam folhas de 1,8-4,0 cm de comprimento, 1-3 cm de largura, formas e tamanhos variados, obovadas a elíptico-oblongas. As flores caracterizam-se por apresentarem pedicelos pilosos, cálice de 1,5 mm de comprimento, lobos ovóide-deltóides, ligeiramente acuminados, ambas as faces pubescente-caducas, raro com glândulas muricadas na face externa (Fig. 1) Fruto de cor quase negro, do tipo baga, globosos, de 4-6 mm de diâmetro com minúsculas sementes dispersas na polpa carnosa de sabor doce e agradável (Fig.2). A propagação da camarinha ocorre naturalmente, através de sementes, tendo os pássaros papel fundamental na sua disseminação (LORENZI et al., 2006).

Estudo realizado por Cipollini, Stiles (1992) revelaram relação entre a presença de compostos fenólicos e atividade antifúngica de frutos maduros da família *Ericaceae*, incluindo o gênero *Gaylussacia*. Outros compostos que fazem parte da composição deste gênero incluem os estilbenos (ASKARI; WORTHEN; SHIMIZU, 1972) e derivados das antocianinas (BALLINGTON et al., 1998). Souza-Fernandes et al. (2002) avaliaram a atividade antiproliferativa do extrato bruto da *Gaylussacia* em cultura de células mononucleares humanas sangüíneas revelando ação citotóxica. Antonio (2004) avaliou a atividade antiproliferativa do extrato diclometânico obtido a partir da parte aérea da *G. brasiliensis* mostrando inibição dependente da

concentração do extrato de células cancerígenas de mama, rim, ovário, próstata e colon.

A**B**

Fig. 1. *Gaylussacia brasiliensis* (A) período de floração; (B) formação dos frutos, Palhoça, SC, 2008

Fonte: Autor

C**D**

Fig. 2. *Gaylussacia brasiliensis* (C) fruto na fase madura; (D) fruto fase de colheita, Palhoça, SC, 2008

Rodrigues et al. (2011) isolaram e identificaram compostos ativos da parte aérea da *G. brasiliensis* apresentando atividade antiproliferativa com morte celular para células cancerígenas de ovário, próstata e rim.

Outro estudo conduzido pela autora foi a correlação entre a atividade antiproliferativa e inibição da cicloxigenase (COX) utilizando extrato de parte aérea da *G. brasiliensis*. Os resultados revelaram que o extrato inibiu 50% da síntese de prostaglandinas (PGE2) na mucosa gástrica de ratos, sugerindo que o mecanismo do composto antitumoral esteja relacionado com a inibição da COX (ANTONIO, 2004).

1.2 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

As células vivas em contato com uma atmosfera rica em oxigênio estão constantemente expostas aos possíveis danos causados por radicais livres e por espécies reativas de oxigênio (EROs) (VANCINI et al., 2005, VALKON et al., 2007).

Radicais livres podem ser definidos como uma espécie química que apresenta um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos, seja pela perda ou ganho de elétrons, permitindo funções de oxidação ou redução. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($\bullet OH$) e o óxido nítrico (NO^{\bullet}) são exemplos de radicais livres (PIÑA; BALMORI, 1996; BIANCHI; ANTUNES, 1999) os quais são produzidos naturalmente nos organismos por meio dos processos metabólicos oxidativos, desempenhando funções importantes no metabolismo, dentre elas, ativação do sistema imunológico e desintoxicação de drogas (DRÖGE, 2002; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Existem, entretanto, compostos igualmente reativos quanto aos radicais livres que não possuem elétrons pareados na última camada e, portanto, não podem ser classificados como radicais livres. Estas substâncias são classificadas como espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) que incluem o peróxido de nitrogênio (H_2O_2), o cátion nitrosonium (NO^+), o ânion nitroxila (NO^-) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (DRÖGE, 2002; VANCINI et al., 2005; NUNES; OLIVEIRA; MORAIS, 2006).

A geração de radicais livres pode ter origem tanto exógena quanto endógena. As fontes exógenas incluem luz ultravioleta, ozônio, tabaco, substâncias tóxicas presentes em alimentos e bebidas (aditivos químicos, hormônios, aflatoxinas), elevado consumo de gorduras saturadas (frituras, embutidos) e agentes químicos

(medicamentos, etanol, praguicidas) (NUNES; OLIVEIRA; MORAIS, 2006). Já as espécies reativas geradas endogenamente podem ser resultantes do próprio metabolismo celular, uma vez que elétrons provenientes da cadeia de transporte de elétrons, localizada na mitocôndria, podem interagir com várias moléculas intracelulares (BERRA; MENCK, 2006; SEIFRIED et al., 2007). Outra fonte endógena de espécies reativas são os fagócitos, que destroem células infectadas por bactérias ou vírus, liberando oxidantes (óxido nítrico, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio), portanto, participando da defesa imune primária do organismo (DRÖGE, 2002; VALKON, et al. 2007). Assim, a geração intracelular de espécies reativas em níveis fisiológicos normais, quando não lesiva a célula, tem importante papel, uma vez que, produzidas de forma controlada atuam na regulação da sinalização celular e expressão gênica (BERRA; MENCK, 2006; SANTOS, 2007; SEIFRIED, et al., 2007; VALKON, et al. 2007).

Porém, quando a formação de radicais livres excede a capacidade antioxidante celular pode haver a geração de uma condição conhecida como estresse oxidativo, podendo levar a danos, dependendo da extensão, da duração e do tipo de oxidante implicado (KRAJCOVICOVAKUDLACKOVA et al., 2003; STAHL; SEIS, 2005; BERRA; MENCK, 2006). Este desequilíbrio pode ser resultante da exposição ambiental aos oxidantes; da ingestão insuficiente de antioxidantes na dieta; do metabolismo de fármacos ou substâncias tóxicas; da ativação excessiva do sistema celular, durante o processo inflamatório; ou ainda das alterações enzimáticas, resultando em níveis patológicos de danos às estruturas celulares (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Existem evidências que a produção de radicais livres contribuem para a etiologia de muitas doenças crônicas, incluindo modificações químicas de proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA que podem resultar em uma variedade de consequências biológicas: lesões teciduais, mutações, carcinogêneses, comprometimento do sistema imunológico, doenças e morte celular (COSTA; MONTEIRO, 2009). Porém a preferência do foco de ataque depende de muitos fatores, como local onde a espécie reativa é gerada, a habilidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e a disponibilidade de íons metálicos associados a esta biomolécula (BULKLEY, 1983; RAHMAN; ADCOCK, 2006).

No entanto, enquanto os lipídeos, proteínas e açúcares podem ser removidos via degradação, o mesmo não ocorre com o DNA, uma vez que é uma molécula responsável por todas as informações genéticas de todas as células de um organismo vivo, propiciando mutações que podem desencadear a carcinogênese (BERRA; MENCK, 2006).

Apesar de todos os componentes celulares serem suscetíveis a ação de diferentes espécies reativas, a membrana é uma das mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e na sua permeabilidade. Consequentemente há perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo das organelas (enzimas hidrolíticas dos lisossomos) e formação de produtos citotóxicos (como malonaldeído), culminando com morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; YU; CHUNG, 2006).

O dano oxidativo aos lipídeos dos constituintes dos vasos sanguíneos contribuem significativamente para o desenvolvimento da aterosclerose e consequente surgimento de doenças do aparelho circulatório (CURIN; ANDRIANTSITOHAINA, 2005; MANACH; MAZUR; SCALBERT, 2005). Outro componente celular comumente atacado pelas EROs são as proteínas, principalmente aquelas com ligações com enxofre e DNA (HALLIEW, 2006). O dano oxidativo à proteína pode ocorrer tanto nela própria - afetando a função de receptores, enzimas, gerando novos antígenos, que provocam respostas imunes -, como pode provocar danos secundários a outras moléculas. O ataque de radicais livres a estes componentes geram radicais aminoácidos, que podem ligar-se ou reagir com O_2 , formando radical peróxil ($HOO\bullet$) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004), associados a processos inflamatórios como a Catarata, o Mal de Parkinson, a Doença de Alzheimer, entre outros (LAWRENCE; BENDICH, 1987; BAGCHI; PURI, 1998; MANACH; MAZUR; SCALBERT, 2005; SZAJDEK; BOROWSKA, 2008).

Acredita-se ainda que as EROs estejam relacionadas à gênese de tumores em diferentes níveis, podendo promover o desenvolvimento de câncer por vários mecanismos: a) alteração e proliferação celular; b) diminuição da afinidade da enzima polimerase; c) inativação das enzimas responsáveis pela degradação de carcinógenos potentes; d) complexação de produtos finais da

peroxidação lipídica à molécula de DNA, criando lesões mutagênicas ao ataque direto do DNA (BAGHI; PURI, 1998). Assim, consideram-se mais graves as lesões causadas ao DNA e RNA, pois as modificações nas bases do DNA (como hidroxitimidina ou hidroxiguanina) podem resultar em mutações, deleções ou ampliações do material genético, considerado pela comunidade científica como primeira etapa para a carcinogênese (BARREIROS; DAVID, 2006; MIN; EBELER, 2008).

No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um organismo para o outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta (DÁVALOS; GOMEZ-CORDOVÉS; BARTOLOMÉ, 2003).

1.3 Mecanismos de defesa antioxidante

1.3.1 Linhas de defesa antioxidante endógena: sistema enzimático e não enzimático

Os processos oxidativos podem ser evitados por meio da modificação das condições ambientais ou pela utilização de mecanismos antioxidantes com propriedades de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas e, assim, reduzir a indução de danos (SIES, 1993; SEIFRIED, 2007). Antioxidantes podem ser definidos como agentes presentes em baixas concentrações quando comparado ao do substrato oxidável, responsáveis pela inibição ou redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células (SANTOS; CRUZ, 2001). O organismo dispõe de diversos mecanismos de defesa antioxidante. Os principais meios de defesa antioxidantes no organismo podem ser divididos em dois grupos: (1) enzimáticos, tais como, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GSH-Px) e, glutatona redutase (GR); e (2) não enzimáticos, tais como, β -caroteno, selênio, α -tocoferol, vitamina C e glutatona (YU, 1994; COULTER; FEHILY; STRAIN, 1999).

O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira linha de defesa endógena ao ataque de EROs, impedindo sua formação ou seqüestram-os e impedindo sua interação com alvos celulares, bloqueando, portanto, a etapa de iniciação da cadeia radicalar (ROVER; HÖEHR; VELLASCO, 2001).

Assim, para minimizar os efeitos deletérios dos agentes oxidantes o organismo induz um incremento na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), nos níveis de grupos tióis não protéicos (NPSH), proteína carbonil e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ALSCHER; ERTUK; HEATH, 2002; RAMAKRISHNA; JAILKHANI, 2007). A SOD é a primeira linha de defesa contra EROs por neutralizar a formação do $O_2^{\cdot -}$ na mitocôndria e H_2O_2 no citosol. O manganês é um importante cofator para SOD mitocondrial, enquanto o zinco e o cobre são importantes na SOD citosólica. A CAT está presente em todas as células, principalmente em peroxissomos, que utilizam o oxigênio para converter H_2O_2 em água e oxigênio. Para que a atividade protetora expressa pela redução de espécies oxidantes, e consequentemente a oxidação da GSH seja mantida precisa ser regenerada através do ciclo catalítico (Figura 3). A glutathione peroxidase (GSH-Px) e a glutathione oxidase (GO) catalisam a reação da glutathione (GSH) com H_2O_2 para formar a glutathione oxidada (GSSG) e água. A glutathione redutase (GR), é responsável pela regeneração do GSH, a partir do GSSG, na presença de NADH (FINALD; LAC; FILAIRE, 2006; HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008; VANCINI; LIRA, 2011). Portanto, as enzimas GSH-Px, GR, SOD e CAT apresentam a mesma função, ou seja, controlam as concentrações de peróxido de hidrogênio e dos hidroperóxidos formados durante os processos de dismutação do íon superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e da peroxidação lipídica, através da sua transformação em H_2O e O_2 respectivamente, neutralizando as ações deletérias por eles às células (YU, 1994; FRIDOVICH, 1997; VANNUCHI et al., 1998, YU; CHUNG, 2006).

A glutathione é um tripeptídeo e existe no organismo em sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (ROVER; HÖEHR; VELLASCO, 2001). É reconhecida como um antioxidante fisiológico chave por sua alta capacidade de doar elétrons combinada com sua alta concentração intracelular, resultando em grande poder redutor (DROGE, 2002). Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG e depleção de GSH. Em situações em que o sistema redox está íntegro, haverá recuperação da GSH via glutathione redutase (GR) na presença de NADPH. Assim, a

magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GGS (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VANNUCCHI, et al., 1998).

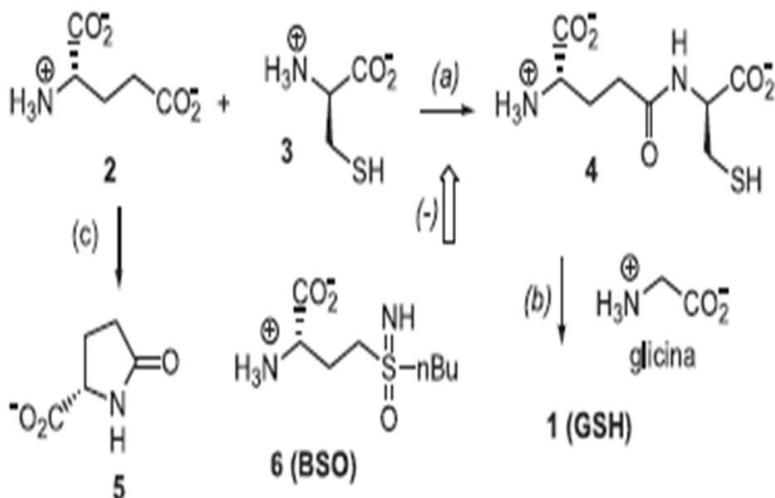


Figura 3. Biossíntese da glutationa e enzimas envolvidas: (a) γ - glutamilcisteína sintetase e (b) glutationa sintetase; (c) γ - glutamilciclotransferase, e butionina sulfoximina (BSO), inibidor da biossíntese da glutationa

Fonte: Huber; Almeida; Fátima, 2008

O grupo antioxidante não-enzimático apresenta, da mesma forma que as enzimas, compostos capazes de prevenir danos oxidativos por interação direta e indireta com as EROs, dentre os quais, estão incluídas a glutationa (sintetizada pela célula), os carotenóides, tocoferóis, polifenóis e ácido ascórbico (provenientes da dieta) (GRANOT; KOHEN, 2004).

Considerando tais fatores, a identificação de compostos antioxidantes vem despertando grande interesse, uma vez que tais compostos podem manter o equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes e a concentração de compostos antioxidantes, minimizando os danos oxidativos no organismo (CHIDAMBARA-MURTHY;

JAYAPRAKASHA; SINGH, 2002, SINGH et al., 2008, ALVES et al. 2010).

1.3.2 Linhas de defesa antioxidante exógenas: componentes da dieta

Os polifenóis têm recebido atenção da comunidade científica por seus numerosos efeitos biológicos, como sequestrador de espécies radiculares de oxigênio (SHAN; CAI; SUN; 2005; ANGELO; JORGE, 2007; D'ARCHIVIO et al., 2007), modulação da atividade de algumas enzimas específicas, inibição da proliferação celular, bem como seu potencial como agente antibactericida, antialérgico e antiinflamatório (BRAVO, 1998; MANACH et al, 2004; LAJOLO; HORST; 2009).

Estudos epidemiológicos têm sugerido associações entre o consumo de alimentos e bebidas ricos em polifenóis e a prevenção de doenças cardiovasculares (TIJBURG et al. 1997; SALONEN, 2002), câncer (YANG; WANG, 1993), diabetes melitos (JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2003; GOTTLIEB; BODANESE; CRUZ, 2009) e doenças neurodegenerativas (GHANI et al., 2002; CHEN et al., 2004; ETMINAN; GILL; SAMII, 2005) . Por outro lado, pesquisas evidenciam que os polifenóis poderiam exercer alguns outros efeitos biológicos tais como a inibição ou redução de diferentes enzimas, entre as quais telomerase, cicloxigenase, lipoxigenase e a interação com e receptores celulares (ANGELO; JORGE, 2007; TAPIERO et al., 2002). Porém, os efeitos benéficos dos polifenóis dependem de seu consumo e biodisponibilidade, incluindo variáveis como, absorção intestinal, metabolismo da flora intestinal, metabolismo hepático, natureza dos metabólitos circulantes, excreção urinária e biliar (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; WILLIAMSON; MANACH, 2005; BOUDET, 2007).

Os fenólicos são pertencentes a uma classe de compostos que inclui grande variedade de estruturas simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, um hidrogênio ou mais é substituído por um grupamento hidroxila (PODSEDEK, 2007). Entre os fenólicos, existem diversas categorias, entre elas, fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (ANGELO; JORGE, 2007; BOUDET, 2007).

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois grandes grupos: um formado pelos ácidos hidroxibenzóicos, que inclui os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatequínico, vanílico e siríngico; outro pelos ácidos hidroxicinâmicos, que inclui os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico (BRAVO, 1998; SOARES, 2002). A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido caféico, que associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (TAPIERO et al., 2002; GARAMBONE; ROSA, 2007). O ácido 5-*o*-cafeoilquínico é o mais comum dos ácidos clorogênicos e o mais conhecido dos fenóis dietéticos biologicamente ativos (CLIFFORD, 2000; JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2003). Devido às suas propriedades redutoras e estrutura química desempenham importante papel na neutralização de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (FARAH; DONANGELO, 2006; SOUSA et al., 2007).

As principais fontes de compostos fenólicos são frutos cítricos, como limão, laranja e tangerina, além de outros como cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão, sendo encontrados em maiores quantidades na polpa quando comparado ao suco do fruto. Pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho e tomate também são excelentes fontes destes compostos (BECKMAN, 2000; BRAVO, 1998; SHAN; CAI; SUN, 2005; LAJOLO; HORST; 2009; COSTA; MONTEIRO, 2009).

Os flavonóides representam o maior grupo de polifenóis encontrados em alimentos (SCALBERT; WILLIANSO, 2000), sendo os compostos de maior diversificação no reino vegetal. Neste grupo encontram-se os flavonóis, catequinas ou flavonas, isoflavonóides antocianidinas (Fig. 1) (BRAVO, 1998; BALASUNDRAM, SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa de vegetais contra ao ataque de patógenos (DIXON; HARRISON, 1990) e estão presentes, na maioria das plantas, distribuídos em suas sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (FELDMANN, 2001; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2001). As principais fontes de flavonóides incluem frutos (uva, cereja, maçã, grosela, frutas cítricas, amora, entre outros) e hortaliças (pimenta, tomate, espinafre, cebola, brócolis, dentre outros) (KARAKAYA, 2004, NACZK; SHAHIDI, 2006).

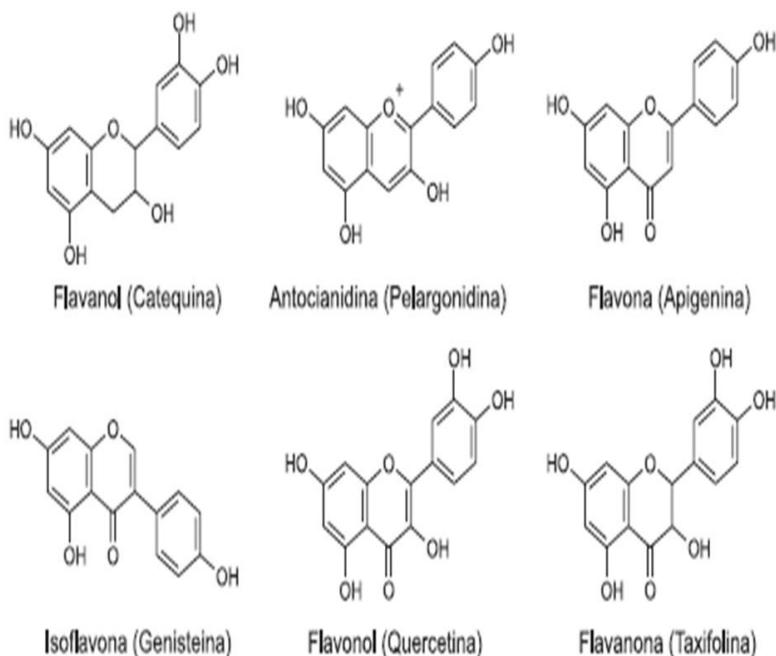


Figura 4. Estrutura das principais classes de flavonóides
 Fonte: Cerqueira; Medeiros; Augusto, 2007

Os principais representantes dos flavonóis são a micertina, quercetina, campferol e fisetina. A quercetina, considerado o principal flavonóide da dieta está presente em frutos, vegetais e bebidas. Entre os flavonóides de maior importância antioxidante encontram-se as catequinas, presentes no chá verde, vinho e cacau (LEE et al., 2003; SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). As isoflavonas estão principalmente representadas pela daidezína e ginestéina, sendo a soja a principal fonte destes compostos. Estas duas isoflavonas têm recebido considerável atenção devida suas propriedades estrogênicas e preventivas de câncer de mama e osteoporose (GANDINI et al. 2000; MESSIMA, 1999; BRESSAN; MONTEIRO, 2001).

A subclasse de flavonóides denominada antocianinas são pigmentos vegetais responsáveis pelas cores laranja, azul, roxa e

tonalidades de vermelho a violeta encontrada em flores, frutos, folhas, caules e tubérculos de plantas (OLIVEIRA et al., 2009; DORNAS et al., 2007). Algumas fontes de antocianinas são o mirtilo, a pitanga, a framboesa, o morango, a groselha, uvas e o vinho tinto (OLIVEIRA, et. al., 2009). Quanto mais intensa a coloração da uva, mais interessante se torna o alimento do ponto de vista funcional, já que as uvas de coloração escura apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante (ABE et al., 2007). Assim, nos últimos anos, o interesse por estes pigmentos intensificou-se diante de resultados que apontam as antocianinas como compostos bioativos, com potencial antioxidante, entre vários outros efeitos farmacológicos (KÄHKÖNEN; HEINONEN, 2003, CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Estes compostos contribuem para a explicação da associação entre dietas ricas em frutas e vegetais e a menor prevalência de doenças crônicas não transmissíveis em populações (JENKINS, 2000; JOHNSON, 2007; SINGH, et. al. 2008)

1.4 Extração, quantificação e identificação de compostos fenólicos

Considerando o grande número de compostos fenólicos presentes nos vegetais, sua presença em baixas concentrações, estruturas diversificadas e possibilidade de interação com outros constituintes celulares, torna-se um desafio à comunidade científica desenvolver métodos mais efetivos e seletivos para a extração e análise de matrizes de diferentes origens (LUTHRIA, 2009). A análise de compostos fenólicos é influenciada pela natureza do composto, o método de extração empregado, o tamanho da amostra, o tempo e as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas (NACZK; SHAHIDI, 2004).

A solubilidade dos fenólicos também é afetada pela polaridade dos solventes utilizados. Portanto, é muito difícil desenvolver um procedimento de extração apropriado para a extração de todos os fenólicos (NACZK; SHAHIDI, 2006). Os solventes mais utilizados para a extração destes compostos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, hexano, dimetilformaldeído e suas combinações (ANGELO; JORGE, 2007, NACZK; SHAHIDI,

2004, MAROSTICA Jr., 2010). Em geral o hexano remove interferentes como lipídeos, carotenóides e clorofila, metanol extrai açúcares, ácido orgânicos e fenóis de baixo peso molecular; o acetato de etila e o éter dietílico extraem fenólicos de baixo peso molecular, enquanto a acetona extrai fenóis poliméricos. O pH também deve ser levado em consideração quando da escolha de um método de extração. A maioria das extrações de polifenóis é realizada em meio ácido, pois geralmente são mais estáveis em pH baixo, e a condição ácida ajuda a manter a neutralidade do polifenol, favorecendo sua extração em solventes orgânicos (TSAO, 2010).

Os procedimentos que antecedem a extração também estão envolvidos no processo e são de extrema importância, pois a coleta e preparação de amostras estão diretamente relacionadas à preservação do conteúdo fenólico. Para evitar a degradação destes compostos, as amostras (plantas, alimentos, fluídos biológicos) são frequentemente secas, liofilizadas ou congeladas antes do processo de extração e o método de armazenamento e temperatura de extração devem ser monitorados a fim de evitar a redução da estabilidade destes compostos decorrente de degradação química, térmica e enzimática (STALIKAS, 2007).

O tempo de extração é outro fator que afeta a disponibilidade de compostos fenólicos. Tempos prolongados de extração aumentam a chance de oxidação dos fenólicos, a menos que agentes redutores sejam adicionados ao sistema solvente. Além disso, a razão amostra/solvente também influencia diretamente a recuperação de compostos fenólicos de plantas (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Atualmente vem sendo testadas técnicas de extração e isolamento de compostos com o intuito de reduzir o consumo de solventes, acelerar e tornar mais eficiente o processo de extração. Dentre as técnicas testadas incluem-se: extração com fluido supercrítico (EFS), extração com líquido pressurizado (ELP), extração assistida por microondas (EAM) e extração assistida por ultrassom (EAU) (GARCIA-SALAS et al., 2010).

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias, são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de

enzimas. Os métodos realizados em análises de compostos fenólicos podem ser classificados em determinação de compostos fenólicos totais e quantificação individual e/ou de um grupo ou classe de compostos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007).

O método espectrofotométrico é uma das metodologias empregadas para estimar o conteúdo de polifenóis totais, flavonóides totais e antocianinas. São métodos que tem como vantagem a sua simplicidade e rapidez, porém não é específico para a avaliação individual dos compostos. Interferências de componentes não polifenólicos (vitamina C) podem causar falsas leituras e assim conduzir a resultados errôneos (TSAO, 2010).

Todos os compostos fenólicos absorvem energia radiante na região ultravioleta, permitindo a quantificação espectrofotométrica de fenóis totais. A quantificação dos compostos fenólicos totais pela metodologia que emprega o reagente de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdênico, presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, pelos fenólicos presentes na amostra a óxido de tungstênio e óxido de molibdênio em meio alcalino (NACZK; SHAHIDI, 2004). Estes óxidos formados apresentam coloração azulada, sendo possível a quantificação da absorvância da solução na região do visível (760nm). No entanto, o reagente de Folin-Ciocalteu não é específico para grupos fenólicos sofrendo interferências de outras substâncias redutoras presentes na amostra, tais como ácido ascórbico e açúcares redutores (ROBARDS, 2003).

As técnicas cromatográficas têm sido amplamente utilizadas, pois permitem identificar e quantificar os compostos individualmente (TSAO; DENG, 2004; TSAO, 2010). A cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são técnicas usadas tanto na separação quanto na quantificação de compostos fenólicos. A elucidação de estruturas tem sido realizada através da combinação de CG e CLAE com a espectrometria de massa, além de outras técnicas relevantes (ANGELO; JORGE, 2007). Alto desempenho da CLAE e cromatografia gasosa em combinação com a espectrometria de massa têm sido comumente utilizadas para caracterização estrutural de fenólicos em alimentos e fluidos biológicos (TOMÁS-BARBERA et al., 2001; MARTINEZ-ORTEGA; GARCIA-PARRILLA; TRONCOSO, 2004).

1.5 Avaliação da capacidade antioxidante

As diferentes metodologias para determinação da capacidade antioxidante podem estar sujeitas a interferências, por isso atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, visto que nenhum ensaio utilizado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (HUANG, OU; PRIOR, 2005; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; TABART et al., 2009). Os métodos químicos para determinação da atividade antioxidante estão divididos quanto à natureza da reação envolvida em dois grupos principais, os que envolvem transferência de elétrons e os que envolvem transferência de átomos de hidrogênio (ALVES et. al., 2010).

Dentre os métodos baseados na transferência de elétrons, têm-se o ORAC (capacidade absorvência do radical oxigênio), o TRAP (potencial antioxidante reativo total); e a inibição da oxidação do ácido linoléico e da lipoproteína de baixa densidade, (LDL). A maioria destas metodologias baseia-se na reação competitiva entre o antioxidante e o substrato para formação do radical por decomposição de compostos azo, permitindo o acompanhamento da reação por ultravioleta ou por fluorescência (ORAC) (ARNAO, 2000; HUANG, OU; PRIOR, 2005). Dentre os métodos baseados na transferência de elétrons têm-se a metodologia do radical ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), FRAP (Potencial antioxidante de redução do ferro) e o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Estas metodologias baseiam-se na redução do substrato por ação de componentes antioxidantes presentes na amostra, que apresentam comportamento espectral distinto no estado oxidado e reduzido (ARNAO, 2000; HUANG, OU; PRIOR, 2005).

Ambos, tanto o método ABTS quanto o DPPH apresentam estabilidade em certas condições (PRIOR; CAO, 1999; ALOTHMAN; BHAT, KARIM, 2009). O DPPH é um radical livre que se pode obter diretamente, sem preparação prévia, porém o método ABTS cujo resultado é expresso em TEAC, proposto por RE et al. (1999), utiliza o reagente ABTS como substrato e emprega o persulfato de potássio para formar quimicamente o radical $ABTS^{\bullet+}$ (KUSKOSKI et al. 2004, ANTOLOVICH et al. 2002, MILLER, 1997). Com o ABTS pode-se medir a atividade antioxidante de

compostos de natureza hidrofílica ou lipofílica, enquanto o método DPPH somente pode se dissolver em meio orgânico (ARNAO, 2000, ANTOLOVICH et al. 2002). Este método tem sido considerado um dos mais representativos para o emprego em modelos de radicais na avaliação da capacidade de remoção de radicais livres (GENOVESE et al., 2008). Outro método utilizado para medir a atividade antioxidante é baseado na capacidade de redução do ferro (FRAP) e não na capacidade de captura de radicais livres. Neste sistema ocorre a redução do íon férrico para íon ferroso, em pH baixo, resultando no aparecimento de um complexo colorido ferroso-tripiridiltriazina (ferroso-TPTZ) absorvido a 593 nm. A absorbância final é interpolada em uma curva padrão de Trolox, e os resultados são expressos como TEAC (BENZIE; STRAIN, 1996, PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

As células que compõem os diferentes tecidos possuem enzimas antioxidantes que participam de forma decisiva nos mecanismos de proteção tecidual contra o estresse oxidativo, das quais a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPX) são as mais referidas. Cada uma destas enzimas tem capacidade de catalisar reações que conduzem à produção de espécies menos reativas ou à neutralização das EROs (POWERS; JI; LEEUWENBURGH, 1999).

Testes que avaliam a atividade de enzimas antioxidantes têm sido utilizados em humanos e animais de laboratório (HANAMURA et al., 2005; NIKI, 2010), como por exemplo a medida da capacidade de varredura de radicais superóxido (SOD) e do peróxido de hidrogênio. A enzima superóxido dismutase (SOD) dismuta os ânions superóxido em O_2 e H_2O_2 , sendo este último substrato para a enzima catalase (CAT) que forma água e oxigênio (LEE; KOO; MIN, 2004).

A utilização de diferentes tecidos animais (fígado, cerebelo, córtex cerebral) como modelo experimental permite a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo, tais como o nível de peroxidação lipídica e protéica, atividade de enzimas antioxidantes, entre outros (CAREGNATO et al., 2008; NIKI, 2010). As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como produtos finais do dano oxidativo aos lipídios de membrana durante o processo de peroxidação lipídica. Dentre os produtos finais da peroxidação lipídica de membranas ocorre a formação de molondialdeído (MDA).

O MDA formado pode reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e resultar na formação de complexos coloridos TBA-MDA, os quais possuem um coeficiente de absorção máxima em 532 nm. Desta forma, a análise da formação de TBARS pode ser empregada convenientemente como um índice do comprometimento lipídico oriundo do dano oxidativo resultante de uma situação de estresse do organismo (PUNTEL et al., 2007).

2 REFERÊNCIAS

- ABE, L.T., MOTA, R.N., LAJOLOLO, F.M., GENOVESE, M.I. Compostos fenólico e capacidade antioxidante de uvas *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p.394-400, 2007.
- ALOTHMAN, A.; BHAT, R.; KARIM, A.A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v.115, p. 785-788, 2009.
- ALSCHER, R.G.; ERTUK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANTOLOVICH, M.;PRENZLER, P.D.;PATSAIDES, E.;MCDONALD, S.;ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, 183-198, 2002.
- ANTONIO, M.A. **Avaliação do potencial antiproliferativo do extrato bruto e princípios ativos isolados da *Gaylussacia brasiliensis***. 2004. 144f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas (SP), 2004.
- ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends Food Science Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.
- ASKARI, A.; WORTHEN, L.R.; SHIMIZU, Y. Gaylussacia: a new stilbene derivate from a species of *Gaylussacia*. **Lloydia**, v. 35, p. 49-54, 1972.

BAGCHI, K, PURI, S. Free radicals and antioxidants in health and disease. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 4, p. 350-360, 1998.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BALLINGTON, J.R.; BALLINGER, W.E.; MANESS E.P. Anthocyanin, aglycone and aglycone-sugar contents of fruits of temperate North American species of *Gaylussacia* (Ericaceae). **Canadian Journal of Plant Science**, v. 68, p. 247-253, 1988.

BARREIROS, A.L.B.S; DAVID, J. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006

BECKMAN, C.H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 101-110, 2000.

BENZIE, F.F.I.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a Measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, p. 70-76, 1996.

BERRA, C.M., MENCK, C.F.M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n.6, p. 1340-1344, 2006

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOUDET, A.M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2722-2725, 2007

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRESSAN, J.; MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 1, p. 43-52, jan./abr., 2001.

BULKLEY, G.B.; The role of oxygen free radicals in human disease processes. **Surgery**, v. 94, p. 407-411, 1983.

CAREGNATO, F.F.; KOLLER, C.E.; MACFALARNE, G.R.; MOREIRA, J.C. The glutathione antioxidant system as a biomarker suite for the assessment of heavy metal exposure and effect in the grey mangrove. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 6, p. 1119-1127, 2008.

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

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H.G. de; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHEN, H.; ZHANG, S.M.; SCHWARZSCHILD, M.A.; HERNÁN, M.A.; LOGROSCINO, G, WILLET, W.C. Folate intake and risk of Parkinson's disease. **American Journal of Epidemiology**; v.160, n. 4, p. 368-375, 2004.

CHIDAMBARA-MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using *in vivo* models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4791-4795, 2002.

CIPOLLINI, M.L.; STILES, E.W. Antifungal activity of ripe ericaceous fruits: phenolic-acid interactions and palatability for dispersers. **Biochemistry System Ecology**, v. 20, p. 501-514, 1992.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1033-1042, 2000.

COSTA, P.R.F.; MONTEIRO, A.R.G. Benefícios dos antioxidantes na alimentação. **Revista de Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 1, p. 87-90, jan./abr., 2009.

COULTER, J.; FEHILY, A.; STRAIN, J.J. Antioxidant enzymes, inflammatory indices and lifestyle factors in older men: a cohort analysis. **The Quarterly Journal of Medicine**, v. 92, p. 579-585, 1999.

CURIN, Y; ANDRIANTSITOHAINA, R. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. **Pharmacological Reports**, v. 57, suppl., p. 97-107, 2005 .

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annals Institute Super Sanità**, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.

DÁVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Commercial dietary antioxidant supplements assayed for their antioxidant activity by different methodologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2512-2519, 2003.

DINI, I.; TENORE, G. C.; DINI, A. Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of *Allium caepa* L. var. *tropeana* (red onion) seeds. **Food Chemistry**, v. 107, p. 613-621, 2008.

DIXON, R.A, HARRISON, M.J. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. **Advances in genetics**, v. 28, p. 165-234, 1990.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Review**, v. 82, p. 47-95, 2002.

ESPIN, J.C; GARCIA-CONESA, M.T.; TOMAS-BARBERÁ, F.A. Nutraceuticals: facts and fiction (review). **Phytochemistry**, v.68, p. 2986-3008, 2007.

- ETMINAN, M.; GILL S.S.; SAMII, A. Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: meta-analysis. **Lancet Neurology**, v. 4, n.6, p. 362-365, 2005.
- FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.23-26, 2006.
- FELDMANN, K.A. Cytochrome P450s as genes for crop improvement. **Current Opinion Plant Biology**, v. 4, p. 162-167, 2001.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica do Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FINALD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress relationship with exercise and training. **Sports Medicine**, v. 36, n. 4, p. 327-358, 2006.
- FREITAS, J.B. de; CÂNDIDO, T.L.N.; SILVA, M.R. Geléia de gabioba: avaliação da aceitabilidade e características físicas e químicas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.38, n.2, p. 87-94, jun. 2008.
- FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. **Journal Biological Chemistry**, v. 272, p.18515–18517, 1997.
- GANDINI, S.; MERZENICH, H.; ROBERTSON, C.; BOYLE, P. Metaanalysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and intake of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. **European Journal Cancer**, v. 36, n. 5, p. 636-46, 2000
- GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição**, v.18, n.2, p. 229-235, abr./jun. 2007
- GARCIA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, 8813-8826, 2010

GENOVESE, M. I.; SILVA M. P.; DE SOUZA, A. E. S. G.; LAJOLO, F. M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology**, v.14, p. 207-214, 2008.

GHANI H, STEVENS D, WEISS J, ROSEMBAUM R. Vitamins and the risk for Parkinson' disease. **Neurology**, v. 56, n. 8, p. 8-9. 2002.

GOTTLIEB, M.G.V.; BODANESE,L.C.; CRUZ, I.B.M. Status antioxidante, *diabete mellitus* II e aterosclerose. **Revista de Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 1, p. 99-106, jan./abr. 2009.

GRANOT, E.; KOHEN, R. Oxidative stress in childhood in health and disease states. **Clinical of Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 3-11, 2004.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v.97, p.1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Bristh Journal of Pharmacology**, v.142, p. 231-255, 2004

HANAMURA, T.; HAGIWARA, T.; HIROKAZU, K. Strutral and functional charaterization of polyphenols isolated from acerola fruit. **Bioscience, Biotechnology and Biochemsitry**, v. 69, n.2, p. 280-286, 2005.

HARBORNE, J.B.; WILLIANS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-56, 2000.

HEIM, K.; TAGLIAFERRO, A.; BOBILYA, D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n.10, p. 572-584, 2001.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VAN DE PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1242-1246, 1993.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; DE FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, 1170-1179, 2008.

HOLLMAN, P.C.H.; HERTOOG, M.G.L.; KATAN, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 57, n.1, p.43-46, 1996.

HUANG, D.; OU B.; PRIOR, R. I. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.1981-1856, 2005.

JENKINS, R.R. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, 2000.

JOHNSON, I.T. Phytochemicals and câncer. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 66, p. 207-215, 2007.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 78, n. 4, p. 728-733, 2003.

KÄHKÖEN, M.P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 51, n.3, p. 628-633, 2003.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 453-464, 2004.

KRAJCOVICOVAKUDLACKOVA, M.; URSINYOVA, M.; BLAZICEK, P.; SPUSTOVA, V.; GINTER, E.; HLADIKOVA, V.; KLVANOVA, J. Free radical disease prevention and nutrition. **Bratislavské Lekárske Listy**, v.104, n. 2, p. 64-68, 2003

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Revista Brasileira Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARILLA, M. C. Actividad antioxidante de pigmentos

antocianicos. **Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.4, 691-693, 2004.

LAJOLO, F. M.; HORST, M. A. Biodisponibilidade de compostos bioativos em alimentos. **In:** Silvia Maria Franciscato Cozzolino. (Org.). Biodisponibilidade de nutrientes. 3 ed. São Paulo: Ed. Manole, 2009, v.1, p. 772-807.

LAGO, E.S.; GOMES, E.; SILVA, R. da. Produção de geléia de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. **Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p. 847-852, 2006.

LAWRENCE, J.M.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **Journal of Faseb**, v. 1, n. 6, p. 441-445, 1987.

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D.B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 633-640, 2004.

LEE, K. W.; KIM, Y. J.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p.7292-7295, 2003.

LEONG, L.P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, v. 76, p. 69-75, 2002.

LIU, S.C.A; LIN, J.T.B.; WANG, C.K.C.; CHEN, H. Y.A.; YANG, D.J.A. Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers. **Food Chemistry**, v. 114, p. 577-581, 2009.

LORENZI, H.; SARTORI, S.F.; BACHER, L.B.; LACERDA, C.T.M. da. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas de consumo in natura**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 137p.

LUTHRIA, D.L. Phenolic compounds analysis in foods and dietary supplements is not the same using different sample preparation procedures. **Acta Horticulturae**, v. 841, p. 381-388, 2009.

MACHADO, F.M.S.; SIMÕES, A.N. Análise custo-efetividade e índice de qualidade da refeição aplicados à Estratégia Global da OMS. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.42, n.1, p. 21-26, 2008.

MANACH, C., SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.727-747, 2004.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion Lipidology**, v. 16, n. 1, p. 77-84, 2005.

MARÓSTICA, M.R.Jr.; LEITE, A.V.; ROMANELLI, N.; DRAGANO, V. Supercritical fluid extraction and stabilization of phenolic compounds from natural sources. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 51-60 51, 2010.

MARTÍNEZ-ORTEGA, M.V.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Comparison of different sample preparation treatments for the analysis of wine phenolic compounds in human plasma by reversed phase high-performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry Acta**, v. 502, n. 1, p. 49-55, 2004.

MESSIMA, M.J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, (suppl.), p. 439-450, 1999.

MILLER, E.C.A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. **Food Chemistry**, v.60, p. 331-337, 1997.

MIN, K.; EBELER, S.E. Flavonoids affects on DNA oxidation at low concentration relevant to physiological level. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 96-104, 2008.

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

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of**

Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 41, p. 1523-1542, 2006.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

NUNES, E.; OLIVEIRA, S.C.; MORAIS, R.N. Radicais livres: conceito, doenças, estresse oxidativo e antioxidantes. **Journal Systems**, v. 1, n.6, 2006. Disponível em: <http://www.fes.br/revistas/agora/ojs/viewarticle.php>. Acesso em: junho 2009.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F., SILVA, C.A., BECHARA, E.J., TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

PIÑA, M.Z.; BALMORI, Y.S. Papel fisiológico de los radicales libres. **Boletín de Educación Bioquímica**, v. 15, n. 4, p. 152-161, 1996.

PODSEDEK, A. Natura antioxidants capacity of brassica vegetables a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p. 1-11, 2007.

POWERS S.K; JI, L.L; LEEUWENBURGH, C. Exercise training induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Medicine Science Sports Exercise**, v.31, p. 987-997, 1999.

PRIOR, R.L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n.11/12, p.1173-1181, 1999.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

PUNTEL, R.L.; ROOS, D.H.; PAIXÃO, M.W.; BRAGA, A.L., ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive species (Tbars) production in

supernatants of homogenates from rat brain, liver and kidney: Effect of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. **Chemico-Biological Interactions**, v.165, p. 87-98, 2007.

RAHMAN, I.; ADCOCK, I.M. Oxidative stress a redox regulation of lung inflammation in COPD. **European Respiratory Journal**, v. 28, n. 1, p. 214-219, 2006.

RAMAKRISHNA, V.; JAILKHANI, R. Evaluation of oxidative stress in Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) patients. **Diagnostic Pathology**, v. 2, n.22, p.1-6, 2007.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. AND RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

ROBARDS, K. Strategies for determination of bioactive phenolics in plants, fruit and vegetables. **Journal Chromatography A**, v. 1000, p. 657-691, 2003.

RODRIGUES, R.A.F., DE CARVALHO, J.E., SOUZA, I.M.O., ANÔNIO, M.A., PIZÃO, P.E., KOHN, L.K., AMARAL, M.C.E., BITTICH, V., FOGLIUO, M.A. Antiproliferative activity, isolation and identification of active compound from *Gaylussacia brasiliensis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, n. 4, p. 622-626, Jul./Aug., 2011.

ROVER JR., L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p.112-119, 2001.

SALONEN, J.T. Clinical trials testing cardiovascular benefits of antioxidant supplementation. **Free Radical Research**, v. 36, n. 12, p. 299-306, 2002.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303–308, 2001.

SANTOS, M.I. Exercício e estresse oxidativo. **Revista Mineira Educação Física**, v. 15, n. 1, p. 70-86, 2007.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. **Journal Nutrition**, v. 130, (supl.), p. 2073S-2085S, 2000.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I.T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81(suppl), p. 215S–2177S., 2005.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v. 10, n.4, p.309-313, 2004.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 18, p. 567-579, 2007.

SHAN, B.; CAI, Y.Z.; SUN, M. Antioxidant capacity of 26 species extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal Agriculture of Food Chemistry**, v. 53, p. 7749-7759, 2005.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. Review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-19, 1993.

SILALAH, J. Anticancer and protective properties of citrus fruit components. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 11, p. 79-84, 2002.

SILVA, R.R.; CERVI, A.C. As Ericaceae Juss. nativas no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Biologica Paraná**, Curitiba, v. 35, n.1-2, p.1-45, 2006.

SINGH, M.; ARSENAULT, M.; SANDERSON, T.; MURTHY, V.; RAMASSAMY, C. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. **Journal Agriculture of Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 4855-4873, 2008.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71- 81, 2002.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.;

BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30: 351-355, 2007.

SOUZA-FERNANDES, E.M.; QUEIROZ, A.B.R.; MARTINS FILHO, O.A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ALVES, T.N.A.; ZANI, C.L..Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Memórias instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1207-1212, 2002.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 30, n. 2, p. 101-7, 2005.

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

SZAJDEK, A.; BOROWSKA, E.J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review. **Plant Foods of Human Nutrition**, v. 63, p. 147-156, 2008.

TABART, J.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J. DEFRAIGNE, J.O.; DOMMES, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1226–1233, 2009.

TAPIERO, H.; TEW, K.D.; NGUYEN, G.B.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 200-207, 2002.

TIJBURG L.B.M.; MATTERN T.; FOLTS J. D.; WEISGERBER U. M.; KATAN M. B. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. **Critical Review Food Science Nutrition**, v, 771-779,1997.

TOMÁS-BARBERA, F.A., CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E., MARIN, A., MUGUERZA, B., GIL-IZQUIERDO, A., CERDA´, B., ET AL. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.3926–3935, 2007.

TOMÁS-BARBERA, F.A; GIL, M.I; CREMIN, P.; WATERHOUSE, A.L; HESS-PIERCE, B.; KADER, A.A. HPLC-DAD-ESIMS Analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, n.10, p.4748-60, 2001.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation Procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v. 812, 85-99, 2004

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols . **Nutrients**, v.2, p.1231-1246; doi:10.3390/nu2121231, 2010.

VALKON, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VANCINI, R.L.; LIRA, C.A.B.; ABOULAFIA, J.; NOUAILHETAS, V.L.A. Radical livre, estresse oxidativo e exercício. Centro de Estudos de Fisiologia do Exercício, UNIFESP. São Paulo, 2005. Disponível em: <www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf>. Acesso em: maio 2009.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M.; CUNHA, D.F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M.V.M, BERNARDES, M.M.; JORDÃO-JR, A.A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, v. 31, p. 31-44, 1998.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **American Journal of Clinical Nutrition.**, v. 81 (suppl), p. 243S–255S, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Geneva, World Health Organization, WHO Technical Report Series, n. 916, 2003.

YANG, C.S; WANG, .Z.Y. Tea and cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, p. 1038-1049, 1993.

YU, B.P. Cellular defenses against reactive oxygen species. **Physiology Review**, v. 74, p. 139-162, 1994.

YU, B.P.; CHUNG, H.Y. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. **Mechanisms of Aging and Development**, v. 127, p. 436-443, 2006.

CAPÍTULO 2
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DO FRUTO DA *GAYLUSSACIA BRASILIENSIS*
(*CAMARINHA*)” NATIVA NO BRASIL

Parte deste artigo foi apresentado na forma de Pôster comentado no XXI Congresso Brasileiro de Nutrição, I Congresso Ibero-Americano de Nutrição, I Simpósio Latino-Americano de Nutrição Esportista – COBRAN 2010 (ANEXO A).

Artigo publicado. “Chemical composition and antioxidant activity of *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha)” grown in Brazil. Food Research International, v. 44, n. 7, p. 2314-2138, 2011. doi:10.1016/j.foodres.2010.09.033 (ANEXO B).

Composição química e atividade antioxidante do fruto da *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha)” nativa no Brasil

Resumo

Este artigo apresenta a composição centesimal e mineral, perfil de ácidos graxos da fração lipídica, conteúdo de polifenóis e antocianinas, e atividade antioxidante do fruto da *Gaylussacia brasiliensis*. Os resultados indicaram a seguinte composição: umidade (81,30%), lipídeos (0,62%), proteínas (0,56%), carboidratos (10,74%), fibra (6,53%), e cinzas (0,25%). Os principais elementos da composição mineral foram o K, Mg, Ca, and Fe. A composição de ácidos graxos foi caracterizada pelo conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (62,2%) e alta relação de PUFA/SFA (2,92). O fruto da *G. brasiliensis* contém considerável quantidade de fenólicos (492,87 mg AG/100 g) e antocianinas (240,43 mg/100 g), que contribuíram para a alta atividade antioxidante. Este estudo aponta para o potencial deste fruto como importante fonte de compostos nutricionais e bioativos disponíveis na flora nativa brasileira.

Palavras-chave: *Gaylussacia brasiliensis*, química dos alimentos, compostos fenólicos, capacidade antioxidante

Chemical composition and antioxidant activity of *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha) grown in Brazil

Abstract

This paper presents the centesimal and mineral composition, fatty acid profile of the lipidic fraction, phenolic and anthocyanin contents, and antioxidant activity of *Gaylussacia brasiliensis* fruit. The results indicated the following composition: moisture (81.30%), lipids (0.62%), proteins (0.56%), carbohydrates (10.74%), dietary fiber (6.53%), and ash (0.25%). The main elements comprising the mineral composition were K, Mg, Ca, and Fe. The fatty acid composition was characterized by content of polyunsaturated fatty acids (62.2%) and a high PUFA/SFA ratio (2.92). The *G. brasiliensis* fruit contained considerable amounts of phenolics (492.87 mgAG/100 g) and anthocyanins (240.43 mg/100 g), which contribute to its high antioxidant activity. This study highlights the potential of this fruit as an important source of both nutritional and bioactive compounds available in the native Brazilian flora.

Keywords: *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha), Food chemistry, Phenolic compounds, Antioxidant capacity

1 Introduction

Fruits are considered foods with high nutritional and low caloric values and are considered sources of vitamins, minerals and fiber (Dini; Tenore, & Dini, 2008). Apart from the nutritional characteristics of their composition, fruits contain substances that are not traditionally classified as nutrients, but are currently being researched in relation to their capacity to intermediate important biochemical functions in human physiology (D'Archivio et al., 2007).

Epidemiological studies have shown an inverse association between the consumption of fruits and vegetables and morbidity-mortality associated with non transmissible chronic diseases (Hollman, Hertog, & Katan, 1996).

Gaylussacia brasiliensis, belonging to the Ericaceae family, is botanically classified as *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng) Meissner var. *brasiliensis*. It is not a highly cultivated fruit, although it is abundant in its natural habitat and is endemic to Brazilian sandbank vegetation. This fruit is found mainly in the states of Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso and Goiás. On the southern coast, it forms part of the beach vegetation, under marine and fluvi-marine influences (Lorenzi et al., 2006). Bushes of dense leafy branches, from 0.3 to 1.0 m in height, grow throughout the year. The fruit comprises black berries weighing 4-6 g/fruit and measuring 1-2 cm in diameter, with miniscule seeds dispersed within the fleshy pulp, which is 100% edible and has a sweet and pleasant flavor (Lorenzi et al., 2006).

Despite its importance, there are few studies reporting on this fruit, and there appears to be no literature worldwide related to its chemical composition. Thus, the aim of this study was to determine the centesimal, mineral and fatty acids profiles of *G.brasiliensis* as well as to evaluate its antioxidant capacity.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Ripe *camarinha* fruits (*G. brasiliensis* (Spreng) Meissner var. *brasiliensis*) were collected in the town of Palhoça in the coastal

region of Santa Catarina State, Brazil, at latitude 27°38'4"S and longitude 48°39'56" W of Greenwich, between the months of February and April, 2008, and identified by Dr. Oscar Benigno Iza of the Universidade do Vale do Itajaí. A voucher specimen no. HBR 52834 (A. Bramorski 01) was deposited at the Barbosa Rodrigues Herbarium (HBR), Itajaí, Santa Catarina, Brazil. Ripe berries were harvested when 50% to 80% of the fruit on the bushes was ripe, and overripe fruit was discarded.

The fruits were picked and were then carefully selected in order to obtain a uniform batch in relation to size and degree of maturity, determined by the intensity of their color. After selection, the fruits were packaged and stored at a temperature of -18 ± 0.2 °C until processed.

2.2. Chemicals

The 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) in the crystallized diammonium salt form, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The Folin–Ciocalteu reagent, methanol, ethanol, and acetone were provided by Merck, and 6-hydroxy-2,5,7,8 tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) was purchased from Aldrich. All reagents were of analytical grade.

2.3. Methods

2.3.1. Centesimal composition

Moisture, ash, protein (N x 6.25) and total lipid content were determined according to AOAC (1998). Total carbohydrate content was determined by the difference between 100 and the sum of the moisture, protein, total lipids and ash content as percentages. The energy value was calculated from the protein, and total lipid and total carbohydrate content was calculated using an Atwater system (Merrill & Watt, 1973). Each determination was performed in triplicate and repeated at least three times.

2.3.2. Mineral composition

G. brasiliensis samples were digested in $\text{HNO}_3\text{:H}_2\text{O}_2$ (3:1) in a microwave oven in hermetically sealed polytetrafluoroethylene (PTFE) vessels. After decomposition, the solution was transferred to a 25 mL volumetric flask. Quantification of the minerals found in the samples was carried out using an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (Perkin-Elmer SCIEX model Elan 6000) (AOAC, 1998), with operating conditions including the following: 1000 W power, argon flow 6.5 L min^{-1} , sample flow 2 mL min^{-1} , and vertical observation height 19 mm. The wavelengths (nm) used included the following: Ca 317.93; Cu 324.75; Fe 259.94; P 178.28; K 766.49; Mg 279.08; Mn 257.67; Na 589.59; and Zn 213.86. The analytical curves were prepared using metal standards in a 5% solution of HNO_3 .

2.3.3. Determination of the fatty acid composition

The lipid fraction, obtained according to Folch, Lees & Sloane (1957), was esterified according to the method of Hartman & Lago (1973). Analysis was carried out in a gas chromatograph (17A Shimadzu/Class GC 10) equipped with a fused silica capillary column SP-2560 (length: 100 m; ID: 0.25 mm). The oven temperature program was $140 \text{ }^\circ\text{C}$ isothermal for 5 min, was increased by $4 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ to $240 \text{ }^\circ\text{C}$, and was maintained for 20 minutes. Vaporization and detector temperatures were set at $250 \text{ }^\circ\text{C}$ and $260 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively. The carrier gas (helium) was kept at a constant flow-rate of 1 mL min^{-1} . Each determination was performed in triplicate and was repeated at least three times.

2.3.4. Extract preparation

The extracts were prepared with fresh fruit in a mass/solvent ratio of 1:20. Four solvents were used including the following: methanol, ethanol, acetone, and water. The extraction was carried out with ultrasound equipment (USC-1400 - Unique®) for a period of 60 min, after which samples were centrifuged at 4000 rpm. The supernatant was used in order to determine total phenolics, total anthocyanins and antioxidant activity.

2.3.5. Determination of Total Phenolics

Total phenolics were determined by the Folin–Ciocalteu method (Singleton & Rossi, 1965), and results were expressed as gallic acid equivalents (GAE, mg/100g fresh fruit weight). A volume of 2 mL of distilled water and 100 μ L of a known dilution of the extract were added to a volumetric test flask. The Folin–Ciocalteu reagent (500 μ L) was added to the solution, which was allowed to react for 2 min followed by addition of 1.5 mL of (20%w/v) sodium carbonate solution. The solutions were mixed and allowed to stand for 2 h at room temperature. Subsequently, the absorbance was measured at 765nm, using a UV-visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1601PC, Japan). A calibration curve was prepared, using a standard solution of gallic acid (20, 40, 60, 80 and 100 mg/L, $r = 0.997$). Results were expressed on a fresh weight (fw) basis as mg gallic acid equivalents/100 g of sample. Each determination was performed in triplicate and was repeated at least three times.

2.3.6. Determination of Total Anthocyanins

Total anthocyanins were determined using a pH differential method (Guisti & Wrolstad, 2001). The extracts were dissolved separately in a potassium chloride buffer (KCL, 0.025 M, pH 1.0) and sodium acetate ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.4 M, pH 4.5), with a pre-determined dilution factor. Sample measurement absorptions were read at 510 and 700 nm against a blank cell containing distilled water. The absorption (A) of the diluted sample was then calculated as follows: $A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$

The monomeric anthocyanin pigment concentration in the original sample was calculated according to the following formula: Anthocyanin content (mg/100g of fresh fruit) = $A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 100 / (\epsilon \times l)$

This equation was applied where cyanidin-3-glucoside molecular weight ($\text{MW} = 449.2 \text{ g mol}^{-1}$) and the molar absorption of cyanidin-3-glucoside ($\epsilon = 26900\text{M}$) constants were used. The anthocyanin content was expressed as milligrams of cyanidin-3-glucoside (cy-3-glu) equivalent per 100g of fresh fruit. Each determination was performed in triplicate and was repeated at least three times.

2.3.7. Evaluation of the Antioxidant Activity

2.3.7.1. ABTS Method

The ABTS method [2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] used was previously described by Re et al. (1999). The ABTS⁺ radical cation was produced by mixing ABTS (7 mM final concentration in 25 mL) with potassium persulfate (2.45 mM final concentration in 25 mL), and the mixture was kept in the dark at room temperature for 16 h. For the analysis, the reagent was diluted in ethanol until the absorption at 734 nm was 0.7 ± 0.02 . The absorption was measured in a Hewlett-Packard 845A spectrophotometer 7 min after the addition of the sample. The results were expressed in TEAC (antioxidant activity equivalent to Trolox) in $\mu\text{mol TEAC}/100\text{g}$ fresh weight. Each determination was performed in triplicate and was repeated at least three times.

2.3.7.2. DPPH[•] Method

The antioxidant capacity of the fruit extracts was also studied through the evaluation of the free radical-scavenging effect on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. The DPPH free radical was commercially available and was prepared at a 0.1 mM concentration (25 mgL^{-1}) in methanol, as described by Sanchez-Moreno, Lurrari, and Saura-Calixto (1998). In the two scavenging methods, the radical was prepared daily and was protected from light. Absorption was recorded to check the stability of the radical throughout the period of analysis. The results were expressed in TEAC (activity equivalent to Trolox) in $\mu\text{mol TEAC}/100\text{g}$ fresh weight. Each determination was performed in triplicate and was repeated at least three times.

2.3.7.3. The FRAP Method

The procedure was described by Benzie and Strain (1996, 1999). The principle of this method is based on the reduction of a ferric $[(\text{Fe}^{+3} (\text{tripyridyltriazine TPTZ})_2)]^{+3}$ complex to its ferrous $[(\text{Fe}^{+2} (\text{TPTZ})_2)]^{+2}$ (blue-colored) form in the presence of antioxidants. FRAP reagent was prepared by mixing 2.5 mL TPTZ solution

(10mM in 40 mM HCl), 25 mL acetate buffer (300mM, pH 3.6), and 2.5 mL FeCl₃·6 H₂O solution (20 mM). After 4-min incubation at 37⁰C, the reagent was used as a blank by determining the absorbance at 593 nm (Hewlett-Packard[®] 8452A). FRAP solution (900µL) was added to 90 µL of distilled water and 30 µL of standards or extracts. In addition to standard curves using trolox (0-500 µL) were run with each set of extracts The results were expressed in TEAC (activity equivalent to Trolox) in µmol TEAC/100g fresh weight. Each determination was performed in triplicate and was repeated at least three times.

2.3.8. Statistical Analysis

All of the analyses using different extraction systems were carried out in triplicate, and the results were presented as averages and standard deviations. To compare the averages, a variance analysis (ANOVA) was carried out (univariate) as well as the Tukey test, with the help of the software Statistica[®] 6.0, version 2001. The significance level considered for the differences between averages was 5% (p< 0.05).

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition

There is no information available in the literature regarding the chemical composition, phenolic compounds content or the antioxidant capacity of *G. brasiliensis* (*camarinha*), therefore we will use as a reference data on other small fruits with known composition which are recognized for their health benefits being important dietary sources of fiber and bioactive compounds, both micronutrients and phytochemicals (D'Archivio et al., 2007; Dini; Tenore, & Dini, 2008). The chemical composition of the *G. brasiliensis* (*camarinha*) fruit is described in Table 1. The moisture level of the fruit was around 81.30%, which lies within the class of fleshy and succulent fruits; a common characteristic in tropical fruits (Lorenzi et al., 2006). The carbohydrate level (10.74%) is the highest calorie contributor, as the total lipid and protein contents do not substantially influence the calculation of the energy value of the produce.

Table 1. Centesimal composition of the *Gaylussacia brasiliensis* fruit^a.

Parameter	<i>Gaylussacia brasiliensis</i> (mg/100g)
Moisture 105°C (% p/p)	81.30 ± 0.09
Lipids (% p/p)	0.62 ± 0.23
Protein (% p/p) ^b	0.56 ± 0.02
Carbohydrates ^c	10.74
Fibers (% p/p)	6.53 ± 0.5
Ashes (% p/p)	0.25 ± 0.02
Caloric value (kcal/kJ) ^d	51 kcal/215 KJ

^aResults presented as mean ± SD, n = 3. ^bN x 6.25.

^cCalculated by the difference of: 100- (% total lipids + % proteins + % moisture + % ashes + % fibers). ^dCalculated by the sum of the percentages of proteins and carbohydrates multiplied by a factor of 4 (Kcal/g) and total lipids multiplied by a factor of 9 (Kcal/g).

The lipid values (0.62%) were shown to be lower than those obtained in a study by Ercisli and Orhan (2008) on other examples of the berry class of fruits including the following: *Morus Alba* (1.10%), *Morus rubra* (0.95%) and *Morus nigra* (0.85%). Therefore, the *G. brasiliensis* fruit appears to be a good low calorie option.

The *camarinha* fruit samples showed a fiber level of 6.53%, corresponding to 100% of insoluble fibers, which could be considered as a food rich in fibers when compared to other small fruits, such as blackberries (5.30%), blueberries (2.40%), strawberries (2.00%), and grapes (0.50%), (USDA, 2008). High fiber content is found in few edible fruits. However, according to Andola et al. (2010), who analyzed the most prominent commercial fruits in India, the berberis species presents a high fiber content, which corroborates with the findings of the present study. The ash content is considered to provide a general measure of quality and is frequently used as a parameter in the assessment (Hofman et al., 2002) of the functional properties of foods, mainly in the case of foods relatively high mineral contents, such as fruits and vegetables. The ash content (0.25%) of *camarinha* is similar to other small-sized

fruits, such as blueberries (0.24%), blackberries (0.37%) and strawberries (0.40%) (USDA, 2008).

With regard to the mineral elements (Table 2), the *G. brasiliensis* fruit contained the main macroelements K (115.4 mg/100 g), Ca (58.2 mg/100 g) and Mg (21.9 mg/100 g) as well as the microelement Fe (6.0 mg/100 g).

Table 2. Mineral composition of the *Gaylussacia brasiliensis* fruit^a

Parameter	<i>Gaylussacia brasiliensis</i> (mg.100g ⁻¹)
Potassium	115.40 ± 1.75
Calcium	58.23 ± 1.34
Magnesium	21.90 ± 1.00
Phosphorus	16.31 ± 0.08
Sodium	13.21 ± 0.02
Iron	6.03 ± 0.03
Zinc	0.40 ± 0.02
Copper	0.10 ± 0.02
Selenium	0.05 ± 0.00
Cobalt	0.04 ± 0.00
Chromium	0.05 ± 0.00
Molybdenum	0.02 ± 0.00

^aResults presented as mean ± SD, n = 3

Fruits in general are a good potassium source, because this cation represents one of the most abundant minerals due to its diversity of functions in plants (Soares et. al., 2004, Andola et al., 2010). Calcium is the second most abundant element in this fruit. This mineral is frequently associated with the quality of fruits (Hofman et al., 2002) and it has been used to increase their texture and firmness, to delay senescence and to reduce the respiration rate (Hofman et al., 2002; Soares et. al., 2004). The content of iron observed in *camarinha* was higher than values reported for other small fruits (USDA, 2008). In the mineral composition of the berry species *Morus sp*, high values were found for K (1,141 mg/100 g), P (235 mg/100 g), and Ca (139 mg/100 g) (Ercisli & Ohran, 2007), but values for Fe (4.3 mg/100 g), Mg (4.0 mg/100 g), and Zn (3.1 mg/100 g) were lower than those obtained in the current study. Zn,

Cu, Se, Co and Cr contents of *camarinha* were very low. The importance of these elements cannot be overemphasized because many enzymes require them as cofactors (Özcan & Haciseferogullari, 2007).

3.2. Fatty acids profile

The results for fatty acid composition, total saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), and polyunsaturated fatty acids (PUFA) of the studied fruit samples are shown in Table 3. Levels of unsaturated fatty acids (78.7%) were found in the *camarinha* fruit (MUFA content (16.5%), and PUFA content (62.2%), with the main ones being linoleic (33.4%) and α -linolenic (28.8%) acids.

Table 3. Fatty acids profile (% p/p) of the *Gaylussacia brasiliensis* fruit^a

Fatty acids	<i>G. brasiliensis</i> (g/100g)
C16:0 (Palmitic)	16.8 ± 0.8
C18:0 (Stearic)	4.5 ± 0.04
C18:1 (Oleic)	16.5 ± 0.3
C18:2 (Linoleic)	33.4 ± 0.2
C18:3 (α -Linolenic)	28.8 ± 0.2
Saturated (SFA)	21.3
Monounsaturated (MUFA)	16.5
Polyunsaturated (PUFA)	62.2

^aResults presented as mean ± SD, n = 3

It is well known that linoleic and α -linolenic acids are two essential fatty acids required by humans (Simpoulos, 2002). The lower omega 6 to omega 3 fatty acids ratio of *G. brasiliensis* fruit provides a better choice from the nutritional point of view. The major saturated fatty acids (SFA) were found in the *camarinha* fruit samples C16:0 and C18:0, and the ratio of PUFA to SFA was 2.92. Parry et al. (2005) reported that α -linolenic acid was the dominant fatty acid in blackberry, blueberry, and red raspberry fruits. Ercisli & Orhan, (2008) revealed that mulberry fruits were rich in linoleic and

palmitic acids, and linolenic was not found. Barros et al. (2010) showed that the dominant fatty acids in strawberry-tree berries were linoleic and α -linolenic acids. The difference observed in the fatty acid compositions may be due to different phases of biosynthesis of these compounds as well as the stages of their biosynthesis and accumulation (Ercisli, 2007).

3.3. Phenolic compounds

The antioxidant potential of phenolic compounds is recognized in the scientific community, as they are singlet oxygen reducers in lipid oxidation reactions and in the chelation of metals. Phenolic compounds present a wide array of pharmacological properties, including antiallergenic, anti-atheriogenic, anti-inflammatory, antimicrobial, and anti-thrombotic effects and have cardio-protective and vasodilating effects (Manach, Mazur, & Scalbert, 2005).

Table 4 shows the total phenolic compounds content and antioxidant capacity of the different extraction systems obtained from the *G. brasiliensis* fruit, determined by the ABTS, DPPH and FRAP methods.

The acetonc extract presented the highest level of total phenolic compounds, with a statistically significant difference ($p < 0.05$) in relation to the other extracts, and there was no difference between the ethanolic and aqueous extracts. According to Julkunen-Tiito (1985), the total phenolic content and antioxidant activity of extracts are significantly dependent on the solvents used, as antioxidant compounds have different polarities. The level of phenolic compounds obtained from the acetonc extract of the *G. brasiliensis* fruit was 492.87 mg GAE/100 g, which was higher than the levels noted in the study by Kuskoski et al. (2006) who carried out research using the pulp of strawberry (132.1 mg GAE/100g), açaf (136.8 mg GAE/100g), grape (117.1 mg GAE/100g), and mulberry (118.9 mg GAE/100g).

Table 4. Total phenolic content and antioxidant activity of the *Gaylussacia brasiliensis* (*camarinha*) fruit extracts^d.

	Acetonic	Methanolic	Ethanolic	Aqueous
Total phenolic ^e	492.9 ± 1.2 ^a	417.8 ± 1.2 ^b	382.5 ± 4.5 ^c	402.6 ± 7.7 ^c
ABTS ^f	2054.7 ± 1.5 ^{a,A}	2041.20 ± 4.03 ^{a,A}	1946.5 ± 2.4 ^{b,A}	1816.5 ± 0.2 ^{c,u}
DPPH ^f	2256.6 ± 92.5 ^{a,B}	2110.6 ± 19.9 ^{a,A}	1698.7 ± 11.3 ^{b,B}	1399.9 ^c ± 3.6 ^{c,E}
FRAP ^f	851.77 ± 21.59 ^{a,C}	765.32 ^c ± 2.60 ^{b,B}	691.98 ± 1.70 ^{c,C}	406.4 ± 10.7 ^{d,C}

^dData was expressed as average ± SD, n = 3.

^eEquivalent to gallic acid (GAE) (mg GAE/100g)

^fTEAC value (µMol/100g) (antioxidant activity equivalent to Trolox).

Different lowercase letters in the same column and different uppercase letters on the same line represent significant statistical differences (Tukey HSD, P<0.05).

Therefore, it can be inferred that the total phenolic content of the *Gaylussacia brasiliensis* (*camarinha*) is similar or higher than that of various other small fruits, for instance, blackberry (486,5 mg GAE/100g), blueberry (399.3 mg GAE/100g, strawberries (148,0 mg GAE/100 g), and grape (126 mg GAE/100g (Sellappan et al., 2002; Zheng et al., 2007; Reddy et al., 2010,).

3.4. Determination of Total Anthocyanins

The anthocyanin content found in the *camarinha* fruit was 240.43 mg cy-3-glu/100 g. On comparing these results with those available in the literature, lower anthocyanin values have been reported for blackberries (152.8 mg cy-3-glu /100 g), blueberry (113.3 mg cy-3-glu/100 g), strawberry (20.1 mg cy-3-glu /100 g) and grape (107.6 mg cy-3-glu /100 g). (Sellappan et al., 2002, Zheng et al., 2007, Khanal, Howard, Prior, 2010). Anthocyanins are potent flavonoid antioxidants that provide health benefits and contribute to antioxidant capacity. These significant properties of anthocyanins play an important role in the prevention of neuronal and cardiovascular diseases, cancer and diabetes, among others (Castaneda-Ovando, et al., 2009).

3.5. Antioxidant activity

The antioxidant activity data for the *G. brasiliensis* fruit extracts presented in Table 4 show that in addition to the total phenolic content, the antioxidant activity was also higher in the acetonetic and methanolic extracts. The average antioxidant values were 1964.72, 1866.46 and 678.86 $\mu\text{Mol TE}/100\text{ g}$, determined by the ABTS, DPPH[•] and FRAP methods, respectively. For the different extracts, there were no significant differences ($p>0.05$) between the ABTS and DPPH[•] methods, which may be due to the similar action mechanisms of these two methods or to the ability of the antioxidant to reduce certain radicals (DPPH[•] and ABTS). The high antioxidant capacity of the *camarinha* fruit is in agreement with data obtained in several previous studies (Sellappan et al., 2002; Vasco et al., 2008; Ogzen, Serçe, & Kaya, 2009; Reddy et al., 2010),

Positive correlation was observed between the total polyphenol content and the antioxidant capacity in the *camarinha* extracts: ABTS ($r = 0.66$), DPPH ($r = 0.79$), FRAP ($r = 0.97$), whereas a less linear correlation between total antioxidant capacity and anthocyanin content were recorded ($r = 0.4259, 0.5656, 0.8457$, respectively). Some authors have found a positive correlation between total phenolic content and antioxidant capacity using the DPPH, ABTS, and FRAP methods (Ercisli et al., 2007, Vasco et al., 2008, Özgen et al., 2009, Reddy et al., 2010). Zheng et al. (in press) reported that both TPC and major anthocyanins correlated significantly with DPPH, ABTS, and FRAP, indicating that anthocyanins and the TPC contributed to the antioxidant activity, which is consistent with the results of the present study.

In the current study, the correlations for the FRAP-ABTS, FRAP-DPPH[•], ABTS-DPPH[•] methods were 0.95, 0.89, and 0.95, respectively, indicating that the *camarinha* extract has comparable activity in all determinations. Other studies have reported correlations of between -0.58 and 0.97, depending on the extractor solvent, the hydrophilicity of the compounds, the sample, and the type of phenolic compound (Thaipong et al., 2006). Each method evaluates the antioxidant capacity according to the conditions and reagent used; therefore, the employment of different methods could assist in the identification of variations in the response to the compounds extracted from fruit samples (Vasco et al., 2008).

4. Conclusions

In relation to the nutritional composition, the *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha) fruit showed high levels of dietary fiber. The total polyphenol content was dependent on the solvent used, demonstrating its positive correlation to the antioxidant capacity of the different *camarinha* extracts. Acetone (100%) and Methanol (100%) were the most efficient solvents for total polyphenol extraction, which is associated with the highest levels of antioxidant activity, verified by the ABTS, DPPH and FRAP methods. In addressing the lack of research on *Gaylussacia brasiliensis*, this study highlights the potential of this fruit as an important source of nutritional and bioactive compounds available in the native Brazilian flora.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Eliseo Soprano and Msc. Antônio Amaury Silva Junior of Epagri (*Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina*) for their support in the development of this work and for recommending the use of the *Gaylussacia brasiliensis* fruit as the subject of this study.

References

- AOAC (1998). *Officials methods of analysis* (16thed.). Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemist.
- Andola, .C., Rawal, R.S., & Bhatt, I.D.. Comparative studies on the nutritive and anti-nutritive properties of fruits in selected berberis species of West Himalaya, India. *Food Research International* (2010), doi:10.1016/J.Foodres.2010.07.017.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Morais, J.S., & Ferreira, I.C.F.R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120, 247-254

Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1999). The ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods of Enzymology*, 229, 15-27.

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., & Galá-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.

D'archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annals Institute Super Sanità*, 43(4), 348-361.

Dini, I., Tenore, G.C., & Dini, A. (2008). Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of *Allium caepa* L. var. *tropeana* (red onion) seeds. *Food Chemistry*, 107, 613-621.

Ercisli S., & Orhan, E. (2008). Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 116(1), 41-46.

Ercisli S. (2007). Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. *Food Chemistry*, 104, 1379-1384.

Folch, J., Lees, M., & Sloane, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

Guisti, M.M., & Wrolstad, R.E. (2001). Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In R. E. Wrolstad, J. Wiley, & Sons, *Current Protocols in food Analytical Chemistry*, (pp. 1-13). New York.

Hartman, L., & Lago, R.C.A. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, 22(8), 175-176.

Hofman, P.J., Vuthapanich, S., Whiley, A.W., Klieber, A., & Simons, D.H. (2002). Tree yield and fruit minerals concentrations

- influence hass avocado fruit quality. *Scientia Horticulture*, 92, 113-123.
- Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L., & Katan, M.B. (1996). Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 57(1), 43-46.
- Julkunen-Tiito, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: Methods for the analysis of certain phenols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 33, 213-217.
- Khanal, R.C., Howard, L.R., & Prior, R.L. (2010) Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins . *Food Research International*, 43, 1464-1469.
- Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Morales, M.T., & Fett, R. (2006). Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins. *Ciência Rural*, 3(4), 1283-1287.
- Lorenzi, H., Sartori, S.F., Bacher, L.B., & Lacerda, C.T.M. da. (2006). *Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas de consumo in natura*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.
- Manach, C., Mazur, A., & Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16, 77-84.
- Merrill, A.L., & Watt, B.K. (1973). *Energy Value of Foods: Basis and Derivation*, Revised U.S. Department of Agriculture, Retrieved November, 15, 2008 from the Department of Agriculture. Agriculture Handbook, 74, 1973. Home page: www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Classics/index.html.
- Özcan, M.M., & Haciseferogullari, H. (2008). The strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and minerals contents. *Journal of Food Engineering*, 78, 1022-1028.
- Özgen, M., serçe, S., & Kaya, C. (2009). Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Scientia Horticulturae*, 119, 275-279.
- Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K. Q., Yurawecz, M. P., Whittaker, P., et al. (2005). Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry

and blueberry seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 566–573.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.

Reddy, C.V.K., Sreeramulu, D., & Raghunath, M. (2010). Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International*, 43, 285-288.

Sanchez-Moreno, C., Lurrari, J.A., & Saura-Calixto, F. (1998). A produce to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270- 276.

Sellappan, S., Akoh, C.C.; & Krewer, G. (2002). Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2432-2438.

Simopoulos, A.P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedic Pharmacotherapy*, 56(8), 365-79.

Singleton, V.L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology Viticulture*, 16, 144-58.

Soares, L.M.V., Shishido, K., Moraes, A.M.M., Moreira, V.A. (2004). Composição mineral de sucos concentrados de frutas brasileiras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(2), 202-206

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, L. K., Zevallos, C., & Hawkins, D (2006). Comparison of ABTS, DPHH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675.

USDA. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2008). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. Food Group: 09 Fruits and fruit Juices. Retrieved November, 20, 2008 from the Nutrient Data Laboratory Home Page: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>

Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, *111*, 4, 816-823.

Zheng, Y., Wang, S.Y., Wang, C.H., & Zheng, W. (2007). Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. *Food Science*

CAPÍTULO 3

EFEITO DO SUCO DA *GAYLUSSACIA BRASILIENSIS* SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS ENZIMAS CONTRA O DANO HEPÁTICO EM RATOS

Artigo submetido à revista Basic of Clinical Pharmacology and Toxicology (ANEXO C).

Efeito do suco da *Gaylussacia brasiliensis* sobre a peroxidação lipídica e atividade antioxidante das enzimas contra o dano hepático em ratos.

Efeito do suco da *Gaylussacia brasiliensis* sobre a peroxidação lipídica e atividade antioxidante das enzimas contra o dano hepático em ratos.

Resumo

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o efeito das dietas suplementadas com o suco da fruto da *Gaylussacia brasiliensis* (*camarinha*) isolado ou em combinação com o metil metanosulfonato (MMS) sobre a peroxidação lipídica e atividade antioxidante de enzimas contra o dano hepático em ratos Wistar. O suco foi administrado uma vez ao dia, nos ratos, por meio de gavagem. Após 30 dias de tratamento todos os animais foram sacrificados e coletadas amostras do sangue e do fígado para determinar a atividade das enzimas aminotransferases (ALT, AST), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), peroxidação lipídica, e a avaliação histológica do fígado. No presente estudo, a administração do MMS afetou marcadores bioquímicos de função hepática. Os níveis séricos SOD, CAT e a peroxidação lipídica no fígado dos ratos foram aumentados na administração aguda de MMS no grupo dos ratos tratados com a dieta básica. Quando a dieta foi suplementada com suco de *camarinha*, a atividades das enzimas e a peroxidação lipídica foram praticamente restauradas e aproximaram-se das observadas no grupo controle. Estudos histológicos mostraram que os grupos expostos ao estresse oxidativo e suplementado com o suco de *camarinha* apresentaram fígado de arquitetura normal, indicando efeito protetor deste fruto. Sobre os resultados deste estudo sugere-se que o suco de *camarinha* mitigou o dano hepático pela inibição do acúmulo lipídico e redução do estresse oxidativo.

Palavras-chave: *Gaylussacia brasiliensis* (*camarinha*), atividade antioxidante, efeito hepatoprotetor, estresse oxidativo

Effect of *Gaylussacia brasiliensis* juice on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity against liver damage in rats.

Abstract

This study aimed to evaluate the possible effect of diets supplemented with *Gaylussacia brasiliensis* (*camarinha*) juice alone or in combination with methyl methanesulfonate (MMS) on the activity of antioxidant enzymes in albino Wistar rats. Juices were administered to the rats by oral gavage once a day. After 30 days of treatment all animals were sacrificed, and blood and liver samples were collected to evaluate aminotransferases (ALT, AST), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) activity, lipid peroxidation, and to carry out a histological assessment of the liver. In this study, MMS administration affected the biochemical markers of liver function. Serum SOD, CAT levels and lipid peroxidation were enhanced ($p < 0.05$) in acute MMS-treated rats nourished with a basal diet. When the diet was supplemented with *camarinha* juice, the activities of these enzymes e lipid damage were practically restored and reached the normal values of control rats. Histological studies showed that groups exposed to oxidative stress and supplemented with *camarinha* juice presented a normal liver architecture, indicating the protective effect of this fruit. On the basis of the above results it could be concluded that *camarinha* juice mitigates hepatic injury by inhibiting hepatic lipid accumulation and reducing oxidative damage.

Key words: Gaylussacia brasiliensis (camarinha), antioxidant activity, hepatoprotective, oxidative stress

Introdução

Gaylussacia brasiliensis, pertencente a família Ericaceae, é botanicamente classificada como *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng) Meissner var. *brasiliensis* e conhecida na região sul do Brasil como “camarinha”. É uma das espécies nativas do Brasil pouco conhecidas e não cultivadas, porém endêmica das restingas brasileiras (LORENZI et al., 2006). É um arbusto de ramos densamente folhosos, medindo de 0,3 a 1,0 metro, produzidos durante todo o ano (LORENZI et al., 2006). Fruto de cor quase negro, medindo de 4 a 6 mm de diâmetro com minúsculas sementes dispersas na polpa carnosa, 100% comestível, de sabor doce e agradável Lorenzi et al., 2006. O fruto da *G. brasiliensis* (*camarinha*) é boa fonte de compostos fenólicos, incluindo antocianinas, apresentando conteúdo superior quando comparado com alguns frutos de pequeno porte como amora, mirtilo, morango e uva (BRAMORSKI et al., 2011).

Frutas são conhecidas como fontes ricas de compostos fenólicos. Apresentam em sua composição quantidades variáveis de ácidos fenólicos (ácido clorogênico e ácido tânico) e flavonóides (antocianinas, proantocianinas, flavonóis e catequinas (KRAJKA-UZNIAK et al., 2009). A ênfase na sua utilização em dietas voltadas à promoção da saúde está bem fundamentada nas evidências acumuladas por várias décadas. O consumo regular e variado de frutas e vegetais é reconhecido fator de proteção para doenças degenerativas incluindo o câncer (KRAJKA-UZNIAK et al., 2009). Estes compostos, considerados potentes antioxidantes, também afetam a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e alteração do DNA *in vitro* e *in vivo* (IGNATOWICZ et al., 2008). Estudos epidemiológicos tem demonstrado o efeito protetor de antioxidantes naturais contra algumas doenças degenerativas (WILLET, 1994; NESS; POWLES, 1997). Neste contexto, existe a necessidade de pesquisas sobre agentes que poderiam prevenir tais prejuízos.

O fígado é órgão envolvido em diversas funções metabólicas, bem como no metabolismo de substâncias tóxicas e toxinas (LEE, KEUM; KU, 2007). Um desequilíbrio em favor de pró-oxidantes em detrimento de antioxidantes pode afetar todos os tipos de moléculas biológicas, incluindo o DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos, podendo resultar em processos como a mutagênese,

carcinogênese, dano as membranas, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e fragmentação (SEIS, 1993).

Alguns mecanismos de proteção endógena estão envolvidos nas reações que limitam a formação de ROS e prejuízos que estas espécies reativas causam ao organismo (SEIS, 1993). Considerando que a proteção não pode ser completa, ou quando a formação de ROS é excessiva, mecanismos de proteção adicionais fornecidos pela dieta antioxidante poderá ser de grande importância. Assim, muitos agentes naturais que apresentam propriedades antioxidantes têm sido propostos para prevenir e ou tratar hepatopatias induzidas pelo estresse oxidativo (LIEBER, 1997; CERVINKOVA; DRAHOTA, 1998).

Apesar de seu potencial efeito em termos de benefícios a saúde, há poucos estudos com a *Gaylussacia brasiliensis* e nenhum dado foi descrito a respeito de seu potencial antioxidante *in vivo*. Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi estabelecer o efeito potencial de dietas suplementadas com o suco de *G. brasiliensis* (camarinha) isolado ou em combinação com metilmetanosulfonato (MMS) sobre a peroxidação lipídica e atividade antioxidante de enzimas contra o dano hepático em ratos Wistar.

2 Material e Métodos

2.1 Amostra

Frutos maduros da camarinha (*G. brasiliensis* (Spreng) Meissner var. *brasiliensis*) foram coletados na região litorânea do município de Palhoça, estado de Santa Catarina, Brasil, em abril de 2008, e identificadas pelo Dr. Oscar Benigno Iza, da Universidade do Vale do Itajaí. A espécie foi identificada sob o nº HBR 52834 (A. Bramorski 01) e depositada no Herbário Barbosa Rodrigues (HBR), Itajaí, Santa Catarina, Brasil. Os frutos foram reunidos e cuidadosamente selecionados, procurando-se obter um lote uniforme quanto ao tamanho e ao grau de maturação, determinado pela intensidade da cor visualmente. Após seleção os frutos foram embalados e armazenados à temperatura de $-18,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ até o processamento.

2.2 Preparo da Amostra

As amostras do suco de *camarinha* foram preparadas semanalmente com 60 g do fruto e adicionados de 50 mL de água destilada estéril, e homogeneizados em moinho de bancada a 7000 rpm. Após homogeneização, o suco foi filtrado em tecido de algodão e estocado em frascos estéreis -18°C para subsequente uso.

2.3 Determinação do conteúdo de fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais do suco

O conteúdo de fenólicos totais do suco de *camarinha* foi determinado espectrofotometricamente (Hewlett-Packard 8452 A Spectrophotometer) segundo o método descrito por Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). A absorbância foi medida a 765 nm e os resultados expressos em mg de equivalente em ácido gálico (EAG)/ 100 mL suco do fruto. O conteúdo total de antocianinas do suco de *camarinha* foi determinado pelo método de diferença de pH (GUISTI; WROLSTAD, 2001). A absorbância foi lida a 520 e 700 nm. Os resultados foram expressos como concentração de pigmentos monoméricos (mg/100 mL) de equivalente de cianidina-3-glicosídeo (mg cy-3-glu Eq/100 mL) do suco do fruto.

2.4 Animais

Para o estudo foram utilizados trinta e seis ratos machos da linhagem *Wistar* pesando entre 200–210 g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Univali e mantidos em condições climatizadas no laboratório, por três dias, antes do início do experimento, permitindo acesso livre a alimentação (dieta comercial peletizada) e água. As dietas para todos os grupos foram preparadas de acordo com a recomendação do *American Institute of Nutrition 1993* (REEVES; NIELSEN; FSHEY, 1993) para a manutenção de ratos adultos (AIN-93M). Durante o experimento os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas de aço inoxidável em sala fechada, com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com fotoperíodo de 12 horas. Este experimento foi realizado de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em

Animais e aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, Santa Catarina, Brasil.

2.5 Tratamento

Os ratos foram distribuídos em seis grupos ao acaso (n=6): *Group I* (GI) serviu como controle negativo e recebeu água destilada por gavagem oral durante o experimento; *Grupo II* (GII) serviu de controle positivo e recebeu água destilada por gavagem oral durante o experimento e no 28^o dia foi administrado por gavagem oral metilmetanosulfonato (MMS) e nos dois dias subsequentes os animais deste grupo receberam água destilada; *Grupo III* (GIII) serviu como controle *camarinha* e recebeu suco de *camarinha* por gavagem oral durante os 30 dias de experimento; *Group IV* (GIV) recebeu suco de *camarinha*, por gavagem oral e no 28^o dia foi administrado MMS e nos dois dias subsequentes recebeu água destilada; *Grupo V* (GV) recebeu água destilada, por gavagem oral, no 28^o dia foi administrado MMS e nos dois dias subsequentes recebeu suco de *camarinha*; *Grupo VI* (GVI) recebeu suco de *camarinha*, por gavagem oral, no 28^o dia foi administrado MMS e nos dois dias subsequentes recebeu suco de *camarinha*. As doses do suco de *camarinha* foram determinadas pelo cálculo da quantidade de suco de uva correspondente a dose diária recomendada para indivíduos adultos do sexo masculino (PARK et al., 2003; DANI et al., 2008). O suco de *camarinha* foi administrado aos ratos (7 μ L do suco de *camarinha*/g peso do animal) uma vez ao dia. Durante o experimento a quantidade de suco foi ajustada de acordo com o peso do animal. O registro do consumo alimentar foi realizado três vezes por semana e o controle de peso diariamente. O ganho de peso foi calculado usando a seguinte equação: ganho peso (gramas) = (peso final- peso inicial). Após a eutanásia foi realizado a pesagem do fígado, e definido como peso absoluto. O peso relativo foi calculado usando o peso do corpo no dia da eutanásia (A) e o peso absoluto (B) utilizando a seguinte equação para reduzir a diferença do peso individual: *peso relativo* (%) = (B/A)*100. O experimento teve duração de 30 dias e no 24^o dia foi suspensa a dieta para manter todos os animais em período de jejum. Após 12 horas de jejum foram coletadas amostras do sangue total da cauda de cada animal para determinação do colesterol total e glicose. Accu-chek® foi usado

para determinação da concentração de glicose e o Accutrend colesterol® para determinação de colesterol. Após a coleta de sangue os animais retornaram às condições do experimento, cada grupo com as suas especificidades. No 28^o dia de experimento foi administrado MMS na proporção de 50 mg/kg de peso do animal nos Grupos II, IV, V, VI via intraperitoneal. Posteriormente, os Grupos III, V, VI receberam suco de camarinha (gavagem oral) até o final do experimento (dois dias) e os Grupos I, II, IV receberam água destilada (gavagem oral) até o final do experimento. No 30^o dia de experimento (48 horas após a administração do MMS), os animais foram anestesiados com Zoletil 50® (50mg/Kg de peso do animal, via intraperitoneal) e realizada a coleta de sangue através da punção cardíaca. O sangue coletado foi centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos e armazenado a -80°C para posterior análise.

2.6 Análises Bioquímicas

Os níveis séricos de aspartato transaminase (TGO/AST) e alanina transaminase (TGP/ALT) foram determinadas utilizando kit comercial de acordo com o protocolo do fabricante usando um analisador Cobas Mira Plus, Roche®. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectofotometricamente a 480 nm (espectofotômetro model UV-1700, Shimadzu, Kyoto, Japan) e expressa em USOD/mg (BANNISTER; CALABRESE, 1987). A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) foi realizada de acordo com o método descrito por Aebi (1984), avaliando a velocidade de decomposição do H₂O₂ a 240 nm e expressa em UCAT/mg de proteína.

2.7 Análise do estresse oxidativo no fígado

A peroxidação lipídica foi monitorada por meio da formação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ao aquecimento, o qual tem sido amplamente adotado como um método sensível para a avaliação da peroxidação lipídica (WILLS, 1966). Resumidamente, as amostras de fígado foram misturadas com 10% de ácido tricloacético e 0,67% ácido tiobarbitúrico e então aquecidas

em banho fervente por 15 minutos. TBARS foi realizado a 535 nm e os resultados expressos em nmol/mg de proteína.

2.8 Avaliação histológica

Fragmetos do lóbulo direito do fígado foram coletados, cortados em pedaços de aproximadamente 3 mm, fixados em 4% de formol, desidratado, clarificado e embebido em parafina. Os fragmentos embebidos em parafina foram seccionados com espessura de 4 μ m e corados com Hematoxilina *Harris* e eosina para análise histológica, utilizando microscópio padrão (40x). Esteatose hepática foi classificada de acordo com a presença de hepatócitos contendo vacúolos de gordura. Os cortes do fígado corados com H&E foram codificados e avaliados cegamente para investigar a presença de esteatose por patologista sem conhecimento dos grupos a que pertencia e conseqüente resposta ao tratamento.

2.9 Análise estatística

Os resultados bioquímicos foram expressos como média e desvio-padrão, e submetidos a análise de variância e teste de *Tukey's* através do software Statistical Package for the Social Sciences - SPSS (Chicago, IL) versão 12.0.

3 Resultados

O conteúdo de fenólicos do suco de *camarinha* usado neste estudo foi em média $275,0 \pm 2,3$ mg EAG/100 mL e para antocianinas monoméricas totais foi $46,0 \pm 2,1$ mg/100mL cy-3-glu.

3.1 Perfil dos animais.

A Tabela 1 apresenta a média do consumo alimentar, ganho de peso, peso do fígado, colesterol e glicose dos grupos de animais consumindo dieta padrão e dietas suplementadas com o suco de *camarinha*.

Tabela 1. Efeito do suco do fruto da camarinha sobre consumo alimentar relativizado, ganho de peso, peso do fígado relativizado após administração MMS, colesterol e glicose.

Grupos	Consumo alimentar (%)	Ganho peso (g)	Peso fígado (%)	Colesterol (mg/dL)	Glicose (mg/dL)
I	7,6±0,3 ^a	112,2±30,8 ^a	3,8±0,3 ^a	152,8 ± 1,6 ^a	83,3± 7,4 ^a
II	8,0±0,4 ^a	116,0±1,3 ^a	3,9±0,3 ^a	153,0 ± 2,3 ^a	75,8± 8,5 ^a
III	7,6±0,3 ^a	117,2±22,3 ^a	3,6±0,1 ^a	152,0 ± 1,1 ^a	92,6± 15,5 ^{a,b}
IV	7,9±0,6 ^a	123,5±15,8 ^a	3,9±0,3 ^a	151,7 ± 2,9 ^a	90,9± 9,5 ^{a,b}
V	8,2±0,2 ^a	115,6±14,5 ^a	4,3±0,4 ^a	152,2 ± 1,8 ^a	75,0± 3,3 ^a
VI	8,2±0,5 ^a	103,3±8,3 ^a	3,9±0,7 ^a	151,8 ± 2,2 ^a	75,8± 3,1 ^{a,b}
p	0,2775	0,5829	0,6688	0,8767	<0,05

Grupos: (GI) controle negativo, controle positivo (GII) H₂O + MMS, (GIII) suco *camarinha*, (GIV) suco *camarinha* + MMS+ H₂O, (GV) H₂O + MMS + suco *camarinha* e (GVI) suco *camarinha* + MMS + suco *camarinha* (média±SD; n=6). Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatísticas (Tukey HSD, p<0,05).

Os resultados foram apresentados de forma a facilitar as comparações entre os grupos de animais tratados com MMS (estressados) e não stressados (sem administração de MMS). Ratos foram distribuídos ao acaso no início do experimento, assegurando que o peso inicial entre os grupos fossem próximos. Dietas foram bem toleradas por todos os grupos, sem sinais de rejeição pelos animais. O consumo alimentar não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos durante quatro semanas de experimento. Adicionalmente, não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso (p>0,05) e no peso relativizado do fígado (p>0,05) entre os seis grupos de animais no final do experimento. Em relação as concentrações de colesterol total e glicose não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre cada grupo e o controle (GI). Contudo, quando comparou-se os grupos que receberam suco de camarinha (GIV, GV, GVI) com o grupo controle camarinha (GIII) foram observadas diferenças estatisticamente significantes (p<0,05). Os grupos III, IV and VI não apresentaram

diferenças estatística entre si. Estes resultados coincidem com o fato dos grupos III, IV e VI terem recebido suco de camarinha no início do experimento, enquanto o grupo V recebeu somente no final do experimento.

3.2 Análises bioquímicas

A atividade das enzimas AST e ALT são reconhecidos marcadores bioquímicos de alterações hepatocelulares. O dano do tecido hepático permite a liberação de quantidades significativas destas enzimas na corrente sanguínea (GOWRI et al., 2008; DOMITROVI et al., 2010). No presente estudo, a administração de MMS afetou os marcadores bioquímicos da função hepática. Como apresentado na Fig.1, os níveis séricos das enzimas AST e ALT foram aumentados ($p < 0,05$) em ratos tratados com dose aguda de MMS e alimentados com dieta basal.

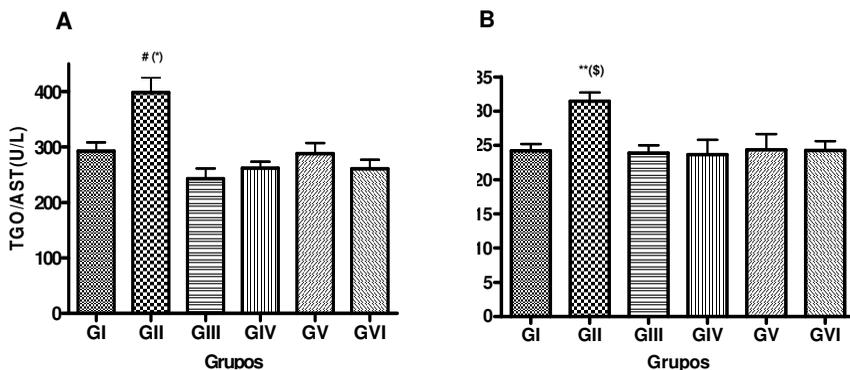


Fig. 1 Atividade das enzimas (A) Aspartato transaminase (AST) e (B) alanina transaminase (ALT) no plasma de ratos.

Grupos: (GI) controle negativo, controle positivo (GII) H₂O + MMS, (GIII) suco *camarinha*, (GIV) suco *camarinha* + MMS+ H₂O (GV) H₂O + MMS + suco *camarinha* e (GVI) suco *camarinha* + MMS + suco *camarinha* (média±SD; n=6).

* $p < 0,001$ comparado com o controle (GI); # $p < 0,001$ comparado com os grupos III, IV, V, VI; ** $p < 0,05$ comparado com controle (I); § $p < 0,05$ comparado com os grupos III, IV, V, VI.

Quando a dieta foi suplementada com suco de *camarinha* (GIV, V, VI), a atividade das enzimas foram praticamente

restauradas e alcançaram valores próximo aos grupos controle (GI) e *camarinha* (GIII). Por outro lado, o suco de *camarinha* administrado sozinho (GIII) não afetou os marcadores bioquímicos. Observou-se uma redução dos níveis séricos das enzimas AST e ALT nos grupos tratados com o suco de *camarinha* em comparação com o grupo controle MMS (GII).

A produção acima do normal de moléculas citotóxicas reativas, causada por agentes tóxicos, pode ser controlada por antioxidantes enzimáticos e moleculares tais como SOD, CAT, GPx, GST, and GSH (EL-SAYED et al., 2006). A enzima SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) para peróxido hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), reação importante no mecanismo antioxidante de defesa celular (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; SHIH; WU; LIN, 2005). O MMS induziu um aumento da atividade sérica de ambas as enzimas SOD e CAT (Fig. 2), bem como, um aumento da peroxidação lipídica (TBARS) no fígado dos ratos controle não tratados (GII) (Fig 3).

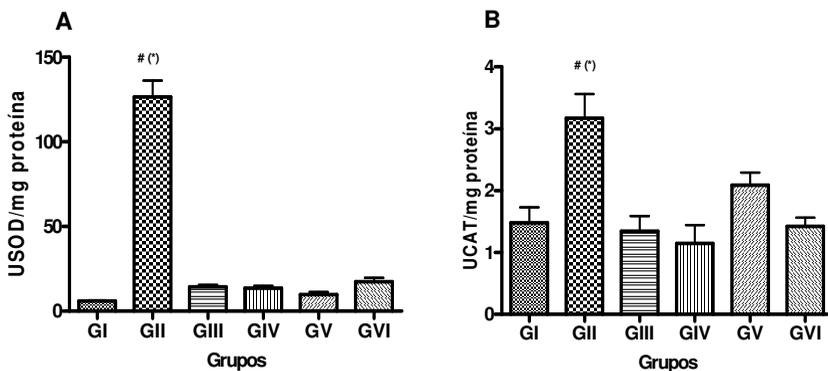


Fig. 2. Atividade das enzimas antioxidantes (A) SOD and (B) CAT no plasma de ratos. Grupos: (GI) controle negativo, controle positivo (GII) H_2O + MMS, (GIII) suco *camarinha*, (GIV) suco *camarinha* + MMS+ H_2O (GV) H_2O + MMS + suco *camarinha* e (GVI) suco *camarinha* + MMS + suco *camarinha* (média \pm SD; n=6), *p<0,001 comparado com o controle (GI); #p<0,001 comparado com os grupos III, IV, VI.

Nos grupos suplementados com suco de camarinha e com MMS (GIV, GV, GVI) observou-se decréscimo significativo da peroxidação lipídica e atividade das enzimas SOD e CAT quando comparados com o grupo controle (GI) e *camarinha* (GIII). A redução da oxidação lipídica foi em torno de 80% no fígado. Portanto, sugere-se que o group II (MMS) não suplementado com suco de *camarinha* apresentou um efeito diferente no balanço oxidativo, o que poderia sugerir um efeito protetor deste fruto contra o dano hepático.

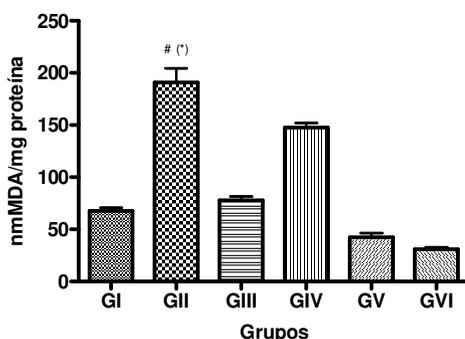


Fig. 3. Peroxidação lipídica no fígado dos ratos. Grupos: (GI) controle negativo, controle positivo (GII) H₂O + MMS, (GIII) suco *camarinha*, (GIV) suco *camarinha* + MMS+ H₂O (GV) H₂O + MMS + suco *camarinha* e (GVI) suco *camarinha* + MMS + suco *camarinha* (média±SD; n=6), *p<0,001 quando comparado com o (I); #p<0,001 e comparado

Avaliação histológica do fígado

Não foram observadas alterações morfológicas nos fígados dos grupos de animais tratados com o suco de *camarinha* (GIII), suco *camarinha*+MMS+H₂O (GIV), H₂O+MMS+ suco *camarinha* (GV) e suco *camarinha*+MMS+suco *camarinha* (GVI) (Fig. 4C, 4D, 4E, 4F) respectivamente.

Todos os fígados analisados apresentaram aspectos similares quando comparados com os fígados do grupo controle (GI).

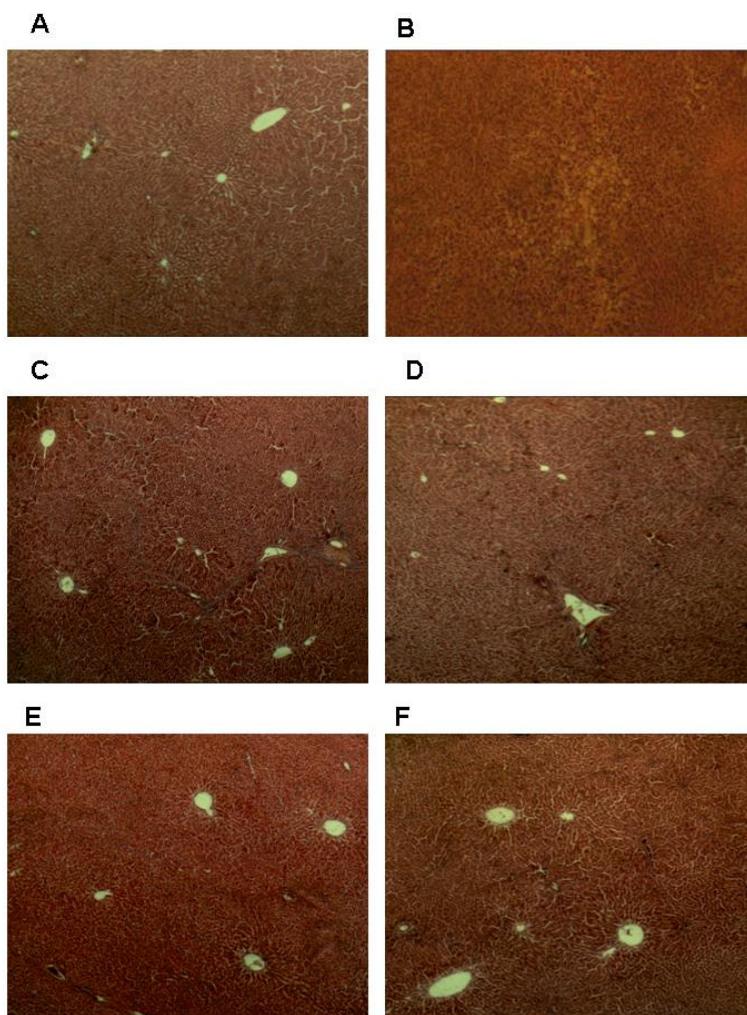


Fig. 4. Fotomicrografia da seção do fígado dos ratos após diferentes tratamentos. (A) GI: controle negativo; (B) GII: controle positivo H₂O + MMS; (C) GIII: suco *camarinha*; (D) GIV: suco *camarinha* + MMS + H₂O; (E) GV: H₂O + MMS + suco *camarinha*; (F) GVI: suco *camarinha* + MMS + suco *camarinha* (H&E x40)

No grupo II (GII), os cortes corados de fígado revelaram vacúolos lipídicos indicando esteatose macrovesicular ao redor da zona periportal. Os hepatócitos apresentaram-se aumentados, mostrando gotículas de lipídeos no citoplasma e núcleo localizado na periferia da célula (Fig. 4B). Não foram observadas evidências de necrose, inflamação e fibrose perisinusoidal nos fígados dos animais tratados com MMS.

Contudo não foi utilizado nenhum método morfométrico para determinar o grau de esteatose, sendo os achados compatíveis com esteatose macrovesicular sem inflamação no parênquima.

4 Discussão

O estresse oxidativo tem sido associado à etiologia de várias doenças hepáticas, frequentemente cursando com o decréscimo das defesas antioxidantes, podendo, porém, ser limitado pelo sistema de defesa do hospedeiro (PAROLA; ROBINO, 2001). Nutrientes e não nutrientes da dieta parecem ser capazes de induzir o sistema de defesa. Em adição ao efeito protetor das enzimas antioxidantes, o consumo de antioxidantes por meio da dieta constitui um importante modulador contra o dano oxidativo endógeno (WILLS, 1966). No presente estudo, os resultados sugerem a ocorrência de estresse oxidativo hepático acompanhado pelas mudanças histológicas e enzimáticas dos animais expostos ao agente tóxico (MMS), o que poderia servir de subsídio para futuras avaliações do potencial para modificação do estado redox hepático por outros agentes. Considerando que o MMS é um potente agente tóxico usado para induzir mudanças no DNA da célula, este estudo sugere que o suco de *camarinha* poderá ser usado como suplemento da dieta para proteger o fígado contra agentes oxidativos. Os resultados obtidos quanto à avaliação das enzimas antioxidantes do fígado em animais que receberam MMS (GII) indicaram alterações dos marcadores de injúria hepática (aminotransferases, enzimas antioxidantes e perfil histológico).

A avaliação do perfil histológico do fígado também forneceu evidências que suportam os resultados das análises bioquímicas. Os fígados dos animais do grupo controle (GI) apresentaram estrutural normal (Fig. 4A), com hepatócitos bem organizados. O grupo II,

controle de MMS, apresentou-se com acúmulo de gotículas de gordura (Fig 4B). Em contraste, a avaliação histológica dos cortes dos tecidos dos ratos expostos ao MMS e suplementados com suco de camarinha mostraram uma histomorfologia mais próxima do normal (Fig. 4D, 4E, 4F).

Uma resposta significativa das enzimas SOD e CAT nos grupos II, IV, V e VI sugerem mecanismos adaptativos de defesas antioxidantes que poderiam ter contribuído para evitar o aumento significativo do dano celular, bem como, a ausência de alterações histológicas nestes grupos.

O aumento significante da enzima SOD no grupo MMS (GII) poderia ser resultado de um aumento na produção do ânion superóxido, um potente radical livre consequente da transformação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio formando o radical hidroxil, o principal iniciador da peroxidação lipídica (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; BRASIL et al., 2007). Por outro lado, o decréscimo da atividade antioxidante das enzimas endógenas poderia ser consequência da presença de antioxidantes da dieta, resultando em concentrações elevadas de antioxidantes exógenos no sistema circulatório e reduzindo o efeito da função das enzimas antioxidantes endógenas (BREINHOLT; LAURIDSEN; DRAGSTED, 1999; ALÍA et al., 2003). Estas teorias contraditórias apontam o conhecimento deficiente do mecanismo de ação dos polifenóis e outros antioxidantes naturais e a implicação fisiológica de uma variação na atividade do sistema enzimático em resposta ao aumento do aporte de antioxidantes da dieta (ALÍA et al., 2003). Um estudo conduzido por Birkner et al., 2005 usando dietas ricas em gordura e baixa em carboidratos mostrou aumento da atividade mitocondrial SOD e GPX, que parece ser uma resposta ao aumento de ROS durante a oxidação de ácidos graxos na mitocôndria. ROS são apontados como um dos principais fatores do depósito de gordura no fígado e consequentemente estabelecimento da esteatose hepática.

5 Conclusão

Os resultados apresentados sugerem que o suco de *camarinha* mitigou o dano hepático inibindo o acúmulo de lipídeo hepático e reduzindo o estresse oxidativo e que os compostos

fenólicos presentes na *camarinha* estariam exercendo importante papel modulatório contra o estresse oxidativo endógeno, em adição ao efeito protetor das enzimas antioxidantes. Contudo, estudos adicinais são necessários para avaliar a eficácia do suco de *camarinha* como um agente anti-hepatotóxico.

Referências

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALÍA, M.; HORCAJO, C.; BRAVO, L.; GOYA, L. Effect of grape dietary fiber on the total antioxidante capacity and the activity of liver antioxidante enzymes in rats. **Nutrition Research**, v. 23, p. 1251-1267, 2003.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Exposure Botanic**, v. 53, p.1331-1341, 2002.

BANNISTER, J.V.; CALABRES, E L. Assays for SOD. **Methods of Biochemical Analytical**, v. 32, p. 279–312, 1997.

BIRKNER, J.E; KASPERCZYK, S.; KASPERCZYK, A.; ZALEJSKA-FIOLKA, J.; ZWIRSKA-KORCZALA, K.; STAWIARSKA-PIĘTA, B.; GRUCKA-MAMCZAR, E. Metabolic and antioxidative changes in liver steatosis induced by high-fat, low-carbohydrate diet in rabbits. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 35, p.187-191, 2005.

BRAMORSKI, A., CHEREM A.R., MEZADRI, T., MELO, S.S, DESCHAMPS F.C, GONZAGA, L.V, ROCKENBACH, I.I., FETT, R. Chemical composition and antioxidant activity of *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha) grown in Brazil. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 2314-2138, 2011.

BRASIL, L.J.; AMARAL, J.L.G.; ZETTLER, C.G.; MARRONI, C.A.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. Modelo experimental de indução de lesão oxidativa hrpática em ratos por halonato. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 44, n. 1, p.1033-1039, 2007

BREINHOLT, V.; LAURIDSEN, S.T.; DRAGSTED, L.O. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. **Xenobiotica**, v. 29, p.1227–40, 1999.

ČERVINKOVA Z, DRAHOTA Z. Enteral administration of lipid emulsion protects liver cytochrome c oxidase from hepatotoxic

action of thioacetamide. **Physiological Research**, v. 47, p. 151-154, 1998.

DANI, C.; OLIBONI, L.S.; PASQUALI, M.A.B.; OLIVEIRA, M.R.; UMEZU, F.M.; SALVADOR, M.; MOREIRA, J.C.F.; HENRIQUES, J.A.P. Intake of Purple Grape Juice as a Hepatoprotective Agent in Wistar Rats. **Journal of Medicine Food**, v.11, n.1, p.127-132, 2008.

DOMITROVI, R.; JAKOVA, H.; ROMI, Z.; RAHELI, D.; TADI, Z. Antifibrotic activity of Taraxacum officinale root in carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 30, p.569–577, 2010.

EL-SAYED, I.H.; LOTFY, M.; EI-KHAWAGA, O.A.; NASIF, W.A.; EL-SHAHAT, M. Prominent free radicals scavenging activity of tannic acid in lead-induced oxidative stress in experimental mice. **Toxicology Indian Health**, v. 22, p. 157-163, 2006.

GOWRI SHANKAR, N.L.; MANAVALAN, R.; VENKAPPAYYA, D.; RAJ, C. Hepatoprotective and antioxidant effects of Commiphora berry (Arn) Engl bark extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. **Food Chemistry Toxicology**, v. 46, p. 3182-3185, 2008.

GUISTI, M.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In *Aurrent Protocols in food Analytical Chemistry*. Edited by Wrolstad RE, Wiley J, Sons. New York; 2001. p.1-13.

IGNATOWICZ, E.; MIKOLAJCZYK, B.; BAER-DUBOWSKA, W. Cloudy apple juice affects total antioxidant status and DNA damage in rats exposed to N-nitrosodiethylamine. **Acta Biochemistry Polymerica**, v. 55 (suppl), p. 268, 2008.

KRAJKA-UZNIAK, V.; SZAEFER, H.; IGNATOWICZ, T.A.; OSZMIANSKI, J.; BAER-DUBOWSKA, W. Effect of Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice on the metabolic activation and detoxication of carcinogenic N-Nitrosodiethylamine in rat liver. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 57, p. 5071-5077, 2009.

LEE, H.S.; KEUM, K.Y.; KU, S.K. Effects of Picrorrhiza Rhizoma water extracts on the acute liver damages induced by carbon tetrachloride. **Journal of Medicine Food**, v.10, n. 1, p. 110-117, 2007.

LIEBER, C.S. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. **Advanced of Pharmacology**, v. 38, p. 601-628, 1997.

LORENZI, H.; SARTORI, S.F.; BACHER, L.B.; LACERDA, C.T.M. DA. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas de consumo in natura**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

NESS, A.R.; POWLES, J.W. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. **International Journal of Epidemiology**, v. 26, n. 1, p. 1-13, 1997.

PARK, Y.K.; PARK, E.; KIM, J.; KANG, M. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. **Mutation Research**, v. 529, p. 77-86, 2003.

PAROLA, M.; ROBINO, G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 35, p. 297-306, 2001.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FSHEY, G.C.JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition and hoc writing Comitee on the reformolument of the AIN-76^a rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, C. Structure-Antioxidant activity relationship of flavonoids and pgenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

SHIH, C.C.;WU, Y.W.; LIN, W.C. Aqueous extract of Anoectochilus formosanus attenuate hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. **Phytomedicine**, v. 12, p.453-460, 2005.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

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

WILLETT, W.C. Diet and health: what should we eat?. **Science**, v. 264, p. 532-537, 1994.

WILLS, E.D. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. **Biochemistry Journal**, v. 99, p. 667-676, 1996.

CAPÍTULO 4

ESTABILIDADE DO CONTEÚDO POLIFENÓIS TOTAIS E ANTOCIANINAS DO FRUTO DA *GAYLUSSACIA* *BRASILIENSIS* E PRODUTOS DERIVADOS DURANTE O ARMAZENAMENTO EM TEMPERATURAS BAIXAS.

Avaliação da estabilidade do conteúdo fenólicos totais e antocianinas do fruto da *Gaylussacia brasiliensis* e produtos derivados durante o armazenamento em baixas temperaturas.

Resumo

Considerando a escassez de pesquisas com o fruto da *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha) e alta perecibilidade pós-colheita, torna-se necessário buscar tecnologias que permitam aumentar a vida de prateleira dos produtos. Neste contexto, o presente artigo teve como objetivo avaliar a estabilidade do conteúdo de fenólicos totais e antocianinas do fruto da *G. brasiliensis* e seus produtos (polpa, suco diluído e concentrado) armazenados em temperatura de refrigeração (5°C) durante 30 dias e congelamento (-15°C) durante 360 dias. Para determinar a concentração de polifenóis totais e antocianinas foram utilizados os métodos Folin-Ciocalteu e diferença de pH, respectivamente. Observou-se um contínuo decréscimo do conteúdo de antocianinas no fruto da *G. brasiliensis* e produtos derivados durante o período de armazenamento em refrigeração (5°C). O fruto *camarinha* apresentou menor retenção do pigmento (25%), seguido pelo suco concentrado (44%) e diluído (57%) depois de 30 dias de armazenamento a 5°C. Ao contrário, quando armazenados a -15°C, o conteúdo de antocianinas comportou-se de forma mais estável, apresentando percentual de retenção superior na amostra do fruto (71,4%), seguido pela polpa (52,3%), suco diluído (42,0%) e suco concentrado (31,4%). Quando comparado a estabilidade do conteúdo de antocianinas e polifenóis totais, os compostos fenólicos foram mais estáveis durante todo o período de armazenamento a 5°C e -15°C. Os valores obtidos indicaram que a *G. brasiliensis* e seus produtos são boas fontes de fenólicos totais e antocianinas, mantendo-se relativamente estáveis durante o armazenamento a temperaturas baixas. O congelamento mostrou-se como método eficiente para a estabilidade dos compostos fenólicos e antocianinas do fruto da *G. brasiliensis* e seus produtos.

Palavras-chave: *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha), estabilidade, compostos fenólicos, antocianinas, frutas de pequeno porte.

Evaluation of stability of total phenols and anthocyanin content of *Gaylussacia brasiliensis* fruit and derived products during storage at low temperatures

Abstract

Considering the scarcity of studies on the fruit of *Gaylussacia brasiliensis* (*camarinha*) and its high post-harvest perishability, there is a need to develop technologies which increase the shelf life of *camarinha* fruit products. In this context, the objective of this study was to evaluate changes in the total polyphenols and anthocyanin content of *G. brasiliensis* fruit and its products (pulp, diluted and concentrated juice) stored under refrigeration (5°C) for 30 days and frozen (-15°C) for 360 days. In order to determine the total polyphenols and anthocyanin concentration the Folin-Ciocalteu and pH difference methods, respectively, were used. A continual decrease in the anthocyanin content was observed in the fruit of *G. brasiliensis* and derived products during the period of storage under refrigeration (5°C). The *camarinha* fruit had the lowest pigment retention (25%), followed by the concentrated juice (44%) and diluted juice (57%) after 30 days of storage at 5°C. In contrast, under storage at -15°C, the anthocyanin content behaved in a more stable manner, with the highest percentage of retention in the fruit (71.4%), followed by the pulp (52.3%), diluted juice (42.0%) and concentrated juice (31.4%). On comparing the stability of the anthocyanin content with the total polyphenols, the phenolic compounds were more stable over the whole period of storage at 5°C and -15°C. The values obtained indicate that *G. brasiliensis* and its products are good sources of total phenolics and anthocyanins, remaining relatively stable during storage at low temperatures. Freezing was found to be the best method in terms of the stability of phenolic compounds and anthocyanins in *camarinha* fruit and its products.

Palavras-chave: *Gaylussacia brasiliensis* (*camarinha*), stability, phenolic compounds, anthocyanins, small fruits.

1 INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que dietas ricas em frutas e vegetais retardam o processo de envelhecimento e previnem as doenças crônicas não transmissíveis, principalmente as do aparelho circulatório e os cânceres, bem como desordens mais específicas, incluindo Artrite reumatóide, Catarata, Doença de Parkinson e Alzheimer (NARWOJSZI; BOROWSKA, 2010).

As frutas são importantes fontes de elementos nutritivos indispensáveis para a alimentação humana, pois são alimentos de baixo valor calórico, ricos em vitaminas, minerais e fibras. Além do valor nutricional, apresentam em sua composição substâncias não tradicionalmente classificadas como nutrientes, mas biologicamente ativas, capazes de intermediar funções bioquímicas primordiais à fisiologia humana, como os antioxidantes (HARBORE; WILLIAMS, 2000; SVILAAS, 2004). Dentre os frutos, alguns de pequeno porte, são ricos de tais compostos como a vitamina C, a vitamina E e os polifenóis (antocianinas, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos) (WANG; LI, 2000, NARWOJSZI; BOROWSKA, 2010). Estas peculiaridades de suas composições justificam o crescente interesse dos pesquisadores em identificar e estudar novas espécies frutíferas (MOURA, 2004).

Dentre as espécies nativas com características sugestivas de altos teores de antioxidantes destaca-se a *camarinha*, pertencente à família Ericaceae, botanicamente classificada como *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng) Meissner var. *brasiliensis*. É uma frutífera não cultivada, endêmica das restingas brasileiras, distribuídas principalmente entre os estados do Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso e Goiás. No litoral sul, integra a vegetação das praias e dunas, sob a influência marinha e fluvio-marinha. É um arbusto de ramos densamente folhosos, de 0,3 a 1,0 m de altura, apresentando frutos de cor escura, globosos, com minúsculas sementes dispersas na polpa carnosa, de sabor doce e agradável (LORENZI et al., 2006). O fruto da *G. brasiliensis* (*camarinha*) é boa fonte de compostos fenólicos, incluindo antocianinas e ácidos fenólicos (BRAMORSKI et al., 2010), apresentando conteúdo superior quando comparado com alguns frutos de pequeno porte como amora, mirtilo, morango e uva (CASTAÑEDA et al., 2009).

Como a maioria das frutas de pequeno porte, a *G. brasiliensis* é altamente perecível após a colheita, tornando-se necessária a escolha de técnicas que permitam aumentar a sua vida de prateleira. Além da refrigeração, outros métodos vêm sendo estudados a fim de reduzir as perdas e aumentar a vida de prateleira do produto *in natura*, destacando-se o congelamento, o armazenamento em atmosfera modificada ou controlada e outras formas de processo, como a produção de sucos, polpas e geléias (CHITARRA; CHITARRA, 2005; HASSIMOTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005; GADELHA et al., 2009).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a estabilidade de polifenóis totais e antocianinas do fruto *Gaylussacia brasiliensis* e seus produtos quando em armazenados em baixas temperaturas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra

Frutos maduros da *G. brasiliensis* foram coletados na região litorânea do município de Palhoça, estado de Santa Catarina, Brasil, abril 2009.

Foram coletados 5 Kg de frutos. Todos os frutos foram reunidos e posteriormente selecionados, procurando-se obter um lote uniforme quanto ao tamanho e ao grau de maturação, determinado pela intensidade da cor visualmente.

2.1.1 Preparo da amostra

Fruto camarinha: Foram distribuídos 30 g do fruto em recipientes fechados, identificados e mantidos a 5⁰C e -15⁰C.

Polpa: Foram utilizados 60 g de amostra, triturados em moinho até obtenção de uma pasta e acondicionados em recipientes fechados com capacidade para 30g, identificados e mantidos a -15⁰C. Este produto não foi armazenado a 5⁰C pois nesta forma não apresenta-se disponível para comercialização,

Suco X (SX): Foram utilizados 50 g do fruto para cada 100 mL de água destilada, homogeneizado em liquidificador, armazenado em frascos com capacidade para 15 mL, identificados e mantidos a 5⁰C e -15⁰C.

Suco Y (SY): Foram utilizados 250 g de camarinha para cada 100 mL de água destilada, homogeneizado em liquidificador, armazenado em frascos com capacidade para 15 mL, identificados e mantidos a 5⁰C e -15⁰C.

2.1.2 Extração das amostras

Para avaliação do conteúdo de polifenóis totais foi pesado 1 g de amostra (camarinha e produtos) e adicionados 20 mL de uma solução de acetona/água (80:20). Para extração do pigmento antocianina pesou-se 1 g de amostra (camarinha e produtos) e adicionou-se 20 mL de metanol acidificado com 0,1% de HCl. Todas as duas extrações foram mantidas por 60 minutos em ultrassom (USC-1400 - Unique®), em seguida centrifugadas a 4000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para a determinação do conteúdo de polifenóis totais e antocianinas das amostras armazenadas a 5⁰C e -15⁰C.

2.1.3 Período de análise

Refrigeração

As análises foram realizadas nos tempos: zero (t_0), 2°, 4°, 6°, 8°, 10°, 15°, 20°, 25° e 30° dia do armazenamento, referentes ao conteúdo de polifenóis totais e antocianinas do fruto, suco X e suco Y. Não foi realizada a avaliação da estabilidade da polpa a 5⁰C, considerando que este produto não apresenta-se disponível para comercialização.

Congelamento

As análises foram realizadas nos tempos: zero (t_0), 15°, 30°, 45°, 60°, 90°, 120°, 150°, 180°, 210, 240°, 300°, 330° e 360° dias, referentes ao conteúdo de polifenóis totais e antocianinas do fruto, polpa, suco concentrado e suco diluído.

2.2 Reagentes

Os reagentes Folin-Ciocalteu, ácido gálico, acetona, carbonato de sódio, cloreto de potássio e acetato de sódio foram adquiridos da empresa Merck®.

2.3 Metodologia

2.3 .1 Determinação do conteúdo de fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais do suco

O conteúdo de fenólicos totais do fruto da *G. brasiliensis* e seus produtos foram determinados espectrofotometricamente (Hewlett-Packard 8452 A) segundo o método descrito por Folin; Ciocalteau (1927). A absorvância foi medida a 765 nm e os resultados expressos em mg equivalente ácido gálico (EAG mg/100g ou 100 mL fruto fresco e/ou produtos). O conteúdo total de antocianinas do fruto da *G. brasiliensis* e seus produtos foi determinado pelo método de diferença de pH (GIUSTI; WROSLSTAD, 2003). A absorvância foi lida a 520 e 700 nm. Os resultados foram expressos como concentração de pigmentos monoméricos em equivalente de cianidina-3-glicosídeo (mg cy-3-glu/100g ou 100 mL) de acordo com a formula: Antocianinas monoméricas (mg/100g) = $(A \times PM \times FD \times 100) / (\epsilon \times 1)$; onde: A = absorvância, PM = peso molecular (449,2), FD = fator de diluição, ϵ = absortividade molar (26900). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão, e submetidos a análise de variância e teste de Tukey's através do software Statistical Package for the Social Sciences – SPSS (Chicafo, IL) versão 12.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a correlação encontrada entre o conteúdo de polifenóis totais e antocianinas do fruto da *G. brasiliensis* e produtos derivados durante o período de armazenamento. Observa-se forte correlação entre o conteúdo de polifenóis totais e antocianinas.

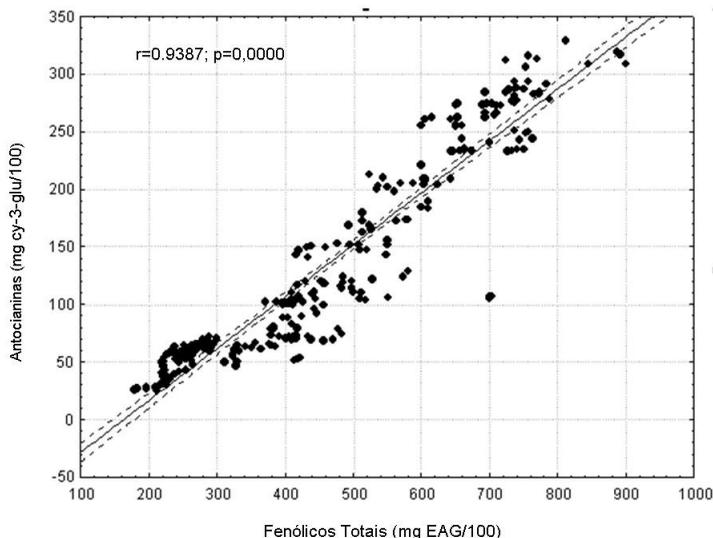


Figura 1. Correlação entre as concentrações de fenólicos e antocianinas do fruto da *G. brasiliensis* e produtos derivados durante o período de armazenamento a 5°C e -

3.1 Conteúdo de antocianinas monoméricas totais e fenólicos totais a 5°C.

O conteúdo inicial (T_0) do pigmento antocianina da *G. brasiliensis* para o fruto, suco concentrado e suco diluído foram: 285,7 mg/100g cy-3-glu; 148,9 mg/100mL cy-3-glu e 63,0 mg/100mL cy-3-glu, respectivamente.

Comparando tais resultados com os disponíveis na literatura, valores similares ou inferiores têm sido reportados para os frutos mirtilo (280,0 mg/100g cy-3-glu), açaí (208,0 mg/100g cy-3-glu), amora preta (152,8 mg/100g cy-3-glu), uva (107,6 mg/100g cy-3-glu) e morango (20,1 mg/100g cy-3-glu) (CONNOR et al., 2002; SELAPAN; AKOH; KREWER, 2002; ZHENG et al., 2007; PACHECO-PALENCIA; TALCOTT, 2010; KHANAL; HOWARD; PRIOR, 2010). De acordo com diferentes pesquisas referentes aos sucos de morango, mirtilo, amora-preta e uva indicaram a presença de: 5,6 mg cy-3-glu/100mL (Torreggiani et al., 1999); 22,9 mg cy-3-glu/100mL (Buckow et al., 2010); 40,1 mg cy-3-glu/100mL (Wang;

Xu, 2007); 2,8 mg cy-3-glu/100mL (Malacrida; Motta, 2005) respetivamente. Assim, pode-se inferir que o fruto da *G. brasiliensis* e produtos são boas fontes do pigmento antocianina. Durante o período de armazenamento a 5°C o conteúdo de antocianinas da camarinha e seus produtos apresentaram mudanças estatisticamente significativas (Figura 2).

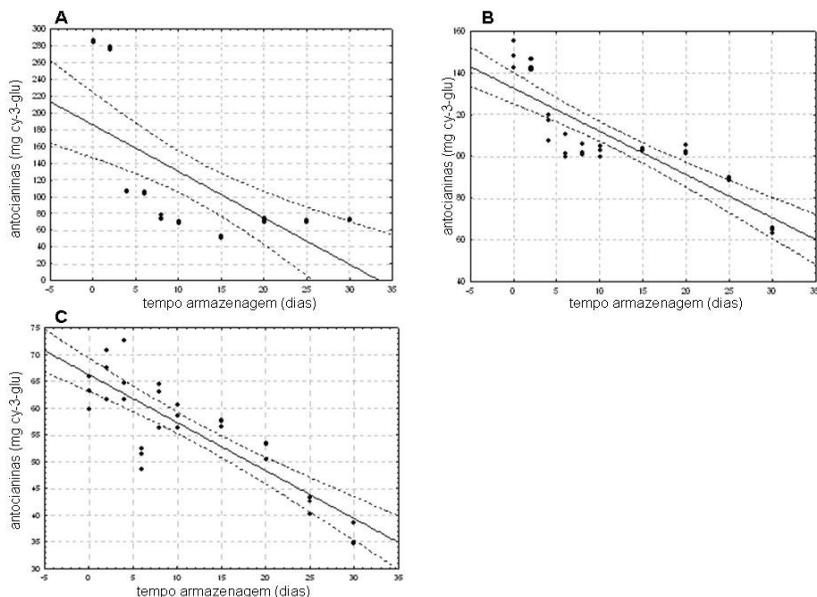


Figura 2. Retas ajustadas e intervalos de confiança para as concentrações de antocianinas do fruto da *G. brasiliensis* e derivados a 5°C. (A) fruto, (B) suco X, (C) suco Y.

Após 30 dias de armazenamento sob refrigeração, a camarinha apresentou menor retenção do pigmento (25%), seguido pelo suco X (44%) e suco Y (57%) (Figura 3). O conteúdo de água presente nas amostras poderia ser um dos fatores que justificam a retenção superior de antocianinas nos sucos. Segundo Pascual-Teresa e Sanchez-Ballesta (2008) as antocianinas em solução aquosa coexistem em quatro espécies de equilíbrio: o cátion flavilium, a base quinoidal, o carbinol ou pseudobase e a chalcona. Dependendo

do pH da solução e estrutura da antocianina a quantidade de equilíbrio de cada forma varia.

Hartmann et al. (2008), ao avaliarem a estabilidade do pigmento antocianina em suco de morango pasteurizado e armazenado a 8^oC, obtiveram perda de 11% do pigmento após três semanas e 23% após sete semanas. Entretanto, diferente do presente estudo, o suco de morango em questão sofreu a inativação de enzimas responsáveis pela degradação das antocianinas, o que lhe confere maior estabilidade no período de armazenamento (MANACH; MAZUR; SCALBERT, 2005).

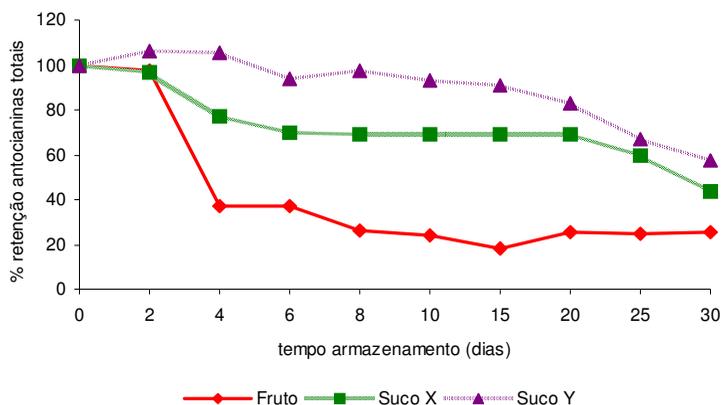


Figura 3. Percentual de retenção do conteúdo de antocianinas do fruto *G. brasiliensis* e produtos durante o armazenamento a 5°C.

Segundo Franchia-Aricha et al. (1997) a redução do conteúdo de antocianinas pode ocorrer durante as etapas de processamento e, principalmente, armazenamento, justificada pela formação de pigmentos mais estáveis que são responsáveis por mudanças no aroma, cor e sabor. Autores têm reportado variações do conteúdo de antocianinas durante o período de estocagem a baixas temperaturas, tal como no morango (KALT; PRANGE; LIDSTER, 1993), no mirtilo (KALT; MCDONALD, 1996) e na framboesa (MAZZA; MINATI, 1993).

Zhang; Quantich; Gricor (2000) analisando o fruto da lichia, encontraram redução de 50% do pigmento após 28 dias a 4°C. Cordenunsi et al.(2005) em estudo com morangos provenientes de diferentes cultivares, obtiveram aumento no conteúdo de antocianinas em cultivares que, inicialmente, possuíam quantidades menores deste pigmento. Ao contrário, os cultivares que inicialmente apresentavam conteúdos superiores de antocianinas, após o sexto dia de armazenamento a 6°C, obtiveram redução deste pigmento. No presente estudo pôde-se observar que as amostras de suco Y, com conteúdos inicialmente inferiores deste pigmento obtiveram retenção superior quando comparadas às amostras do fruto de camarinha com conteúdo inicialmente superior.

Durante o período de armazenamento a 5°C, os valores do conteúdo de polifenóis do fruto *G. brasiliensis* variaram de 744,7 a 406,5 (mg GAE/100g); 535,9 a 379,6 (mg GAE/100mL) para o suco X e 291,9 a 228,2 (mg GAE/100mL) para o suco Y. Observou-se que o conteúdo de fenólicos totais do fruto camarinha e seus produtos apresentaram valores similares ou superiores a alguns frutos de pequeno porte como o mirtilo (280,0 mg GAE/100g), amora-preta (486,5 mg GAE/100g), morango (148,0 mg GAE/100g), açaí (20,8 mg GAE/100g) e uva (126,0 mg GAE/100g) (CONNOR et al., 2002, SELLAPAN; AKOH; KREWER, 2002; ZHENG et al., 2007; PACHECO-PALENCIA; TALCOTT, 2010; PELEGRINI et al., 2000). Frankel et al.(1998), analisando compostos fenólicos em suco de uva concentrado, obtiveram valores médios de 170,0 mg GAE/100mL. Em estudo conduzido por Malacrida e Motta (2005), buscando quantificar os fenólicos totais em suco de uva diluído, encontraram valor médio de 143,0 mg GAE/100mL.

Variações ocorreram no conteúdo de polifenóis totais do fruto da *G. brasiliensis* (camarinha) e seus produtos durante o período de refrigeração, apresentando diferenças estatisticamente significativas (Figura 4).

A camarinha apresentou menor retenção de compostos fenólicos (54,6%) quando comparada aos seus produtos: suco concentrado (70,8%) e suco diluído (78,2%) (Figura 6).

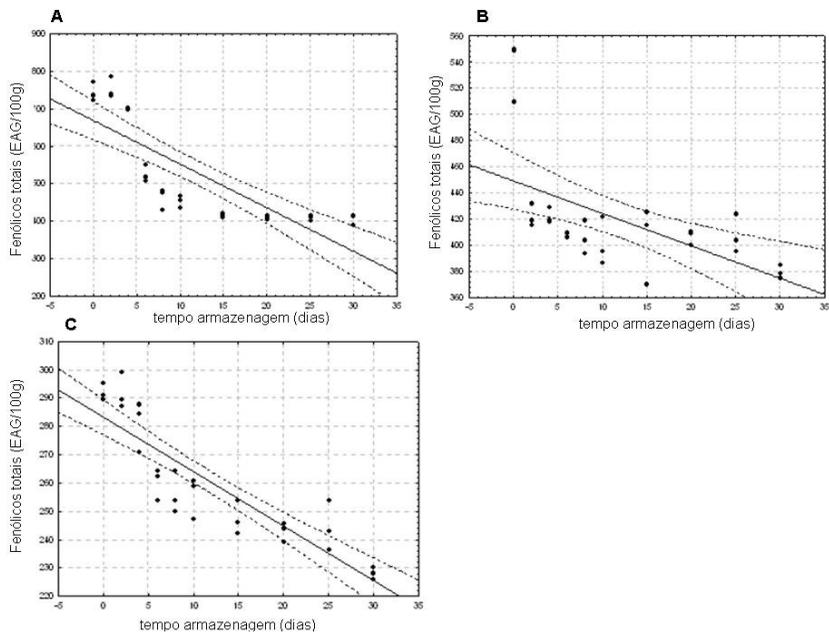


Figura 4. Retas ajustadas e intervalos de confiança para as concentrações de fenólicos totais do fruto da *G. brasiliensis* e derivados a 5°C. (A) fruto, (B) suco X, (C) suco Y

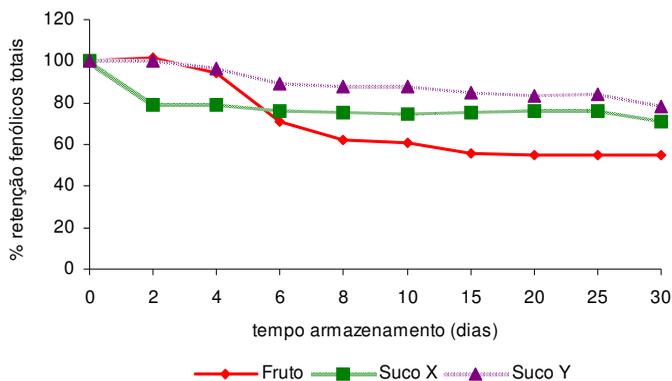


Figura 5. Percentual de retenção do conteúdo de fenólicos totais do fruto *G. brasiliensis* e produtos durante o armazenamento a 5°C.

Segundo Pascual-Teresa e Sanchez-Ballesta (2008), uma possível redução do conteúdo de polifenóis totais poderia estar relacionada à polimerização das antocianinas, que resulta na diminuição da concentração deste pigmento e, conseqüentemente, redução nos teores de compostos fenólicos totais.

Porém, quando comparado a estabilidade do pigmento antocianina com os compostos fenólicos, observa-se que o conteúdo fenólico apresenta-se de forma mais estável a 5^oC (Figura 6).

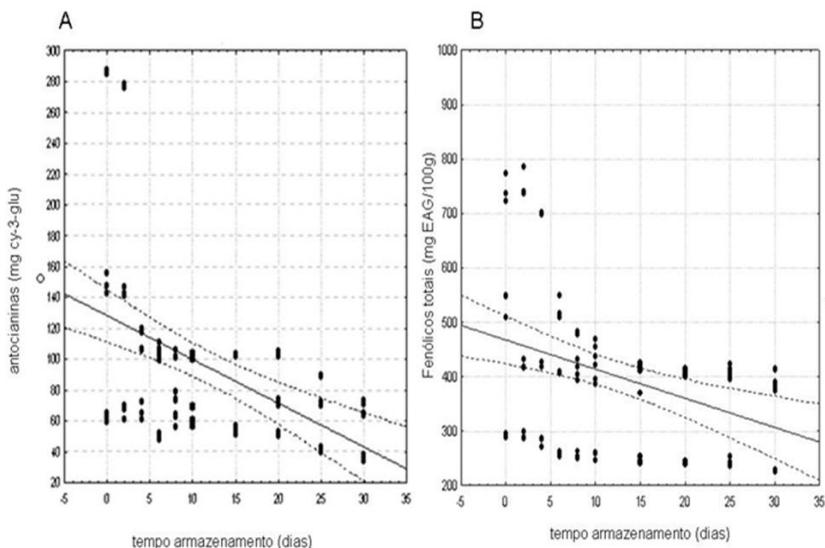


Figura 6. Retas ajustadas e intervalos de confiança para as concentrações de antocianinas (A) e fenólicos (B) do fruto da *G. brasiliensis* e derivados a 5^oC

3.2 Mudanças do conteúdo de antocianinas monoméricas totais e fenólicos totais a -15^oC

A Figura 7 apresenta as retas ajustadas intervalos de confiança para as concentrações de antocianinas do fruto da *G. brasiliensis* e produtos durante o armazenamento a -15. Observa-se

que o conteúdo de antocianinas apresentou-se de forma mais estável quando comparado ao mesmo período durante o armazenamento a 5°C (Fig. 2). Segundo Ancos et al. (2000), durante o congelamento as reações metabólicas são reduzidas, porém, não totalmente inibidas, o que justifica a degradação do pigmento antocianínico.

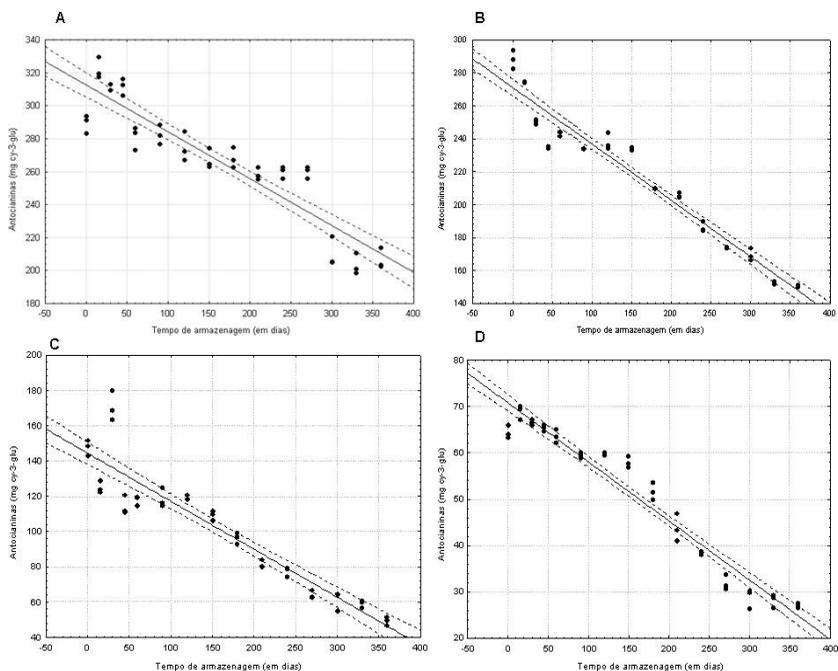


Figura 7. Retas ajustadas e intervalos de confiança para as concentrações de antocianinas totais do fruto da *G. brasiliensis* e derivados a -15°C. (A) fruto, (B) polpa, (C) suco X e (D) suco

O conteúdo inicial de antocianinas foi superior no fruto (289,3 mg/100g cy-3-glu), seguido da polpa (287,9 mg/100g cy-3-glu); suco concentrado (147,6 mg/100mL cy-3-glu) e suco diluído (64,4 mg/100mL cy-3-glu).

Gancel et al.(2010) avaliando a concentração inicial de antocianinas em amora preta congelada obtiveram o valor de 126,3 mg/100g cy-3-glu. Scibisz; Mitek (2007) em estudo com mirtilos, obtiveram no tempo zero o valor médio de 140 mg/100g cy-3-glu.

Após 60 dias de armazenamento, o fruto da camarinha revelou perda de 3% de seu conteúdo antocianínico, que foi ligeiramente reduzido aos 180 dias de armazenamento (perda de 5%) o que permite inferir que o congelamento foi a melhor forma de armazenamento quando comparado à refrigeração. Resultados similares foram obtidos por Scibisz; Mitek (2007) em congelamento de mirtilos a -18°C por seis meses; González; Bergoña; Cano (2003) ao analisar o conteúdo de antocianinas em amora preta congelada por um ano a -24°C . Lima et al.(2002) observaram, após 180 dias, perda de apenas 4,2% do pigmento em polpa de acerola armazenada a -18°C . Entretanto, Chaovanalikit; Wrolstad (2004) demonstraram perdas de até 88% do pigmento em cerejas estocadas por 6 meses a -23°C . O percentual de retenção (Figura 8) do pigmento antocianínico foi maior na amostra do fruto da camarinha (71,4%), seguido pela polpa (52,3%), suco diluído (42,0%) e suco concentrado (31,4%).

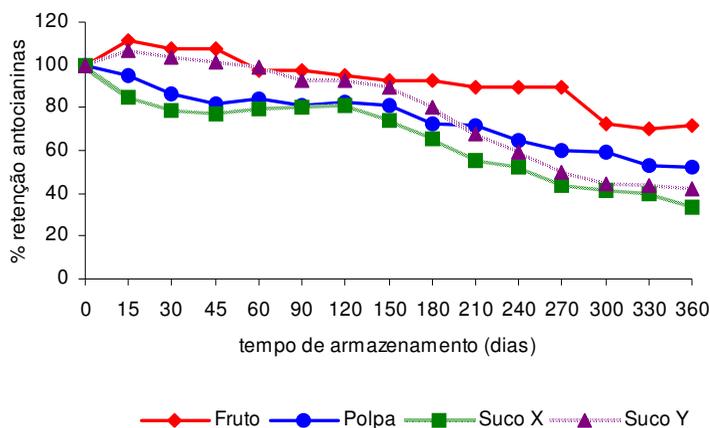


Figura 8. Retenção do conteúdo de antocianinas totais do fruto da *G. brasiliensis* e produtos durante o armazenamento a -15°C .

Diferente do resultado obtido para o fruto da camarinha, a polpa apresentou-se menos estável ao congelamento, provavelmente devido ao processamento (trituração) ocorrido antes do congelamento, pois assim, suas células perdem a integridade do sistema de membranas, possibilitando a ação das enzimas sobre o

substrato o que leva ao escurecimento, resultado na perda do conteúdo de antocianinas (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Ao final do período de armazenamento a -15°C , o conteúdo de antocianinas da polpa foi de 150,5 mg/100g cy-3-glu. Kuskoski et al. (2006) igualmente buscando avaliar a quantidade de antocianinas em polpas de frutas comercializadas mantidas a -15°C , obtiveram os valores: polpa de amora (41,8 mg/100g cy-3-glu), polpa de uva (30,9 mg/100g cy-3-glu), polpa de açaí (22,8 mg/100g cy-3glu) e polpa de morango (23,7 mg/100g cy-3glu), valores estes inferiores ao do fruto da camarinha armazenados durante 360 dias a -15°C . Ambos os sucos, X e Y, apresentaram-se estáveis até 150 dias de armazenamento, seguindo comportamento similar ao tratamento refrigerado, porém com perdas menores deste composto. A Figura 9 apresenta os resultados da estabilidade do conteúdo de polifenóis totais do fruto *G. brasiliensis* e seus produtos durante o armazenamento a -15°C .

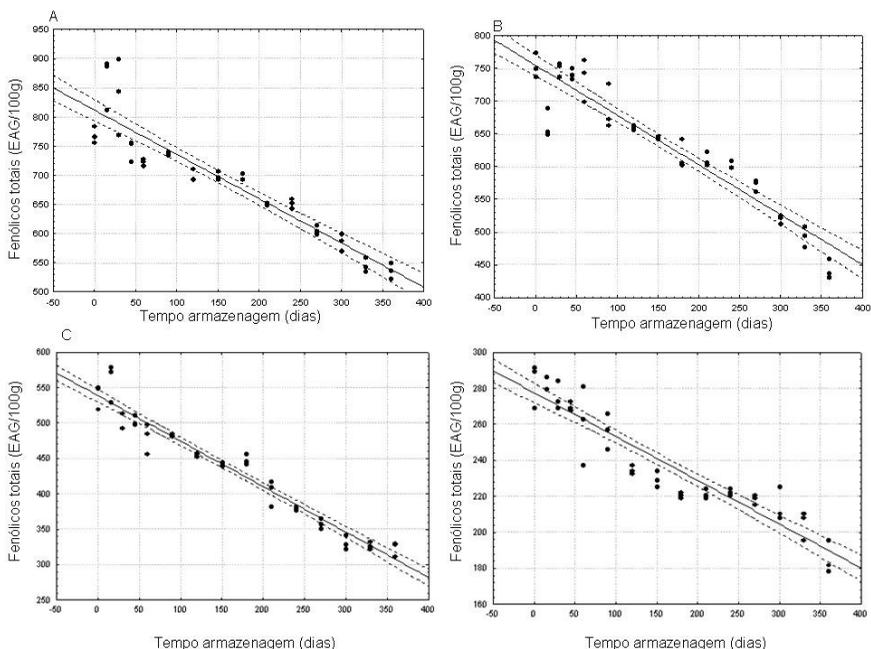


Figura 9. Retas ajustadas e intervalos de confiança para as concentrações de fenólicos totais do fruto da *G. brasiliensis* e derivados a -15°C . (A) fruto, (B) polpa, (C) suco X e (D) suco Y.

No tempo zero, o fruto apresentou conteúdo de polifenóis de 768,6 mg GAE/100g, na polpa 753,3 mg GAE/100g, no suco concentrado 539,2 mg GAE/100mL e no suco diluído 283,2 mg GAE/100mL. Scibisk; Mitek (2007) ao quantificar os fenólicos totais em mirtilo estocado a -18°C obtiveram, no tempo zero, o valor de 427 mg GAE/100g, resultado este inferior ao observado no presente estudo para o fruto.

Quando comparado a estabilidade do conteúdo de antocianinas e polifenóis totais, observa-se que os compostos fenólicos foram mais estáveis durante todo o período de armazenamento a -15°C , demonstrado pelos resultados de retenção deste composto (Fig. 10). Em ordem decrescente de retenção; 69,8% (fruto), 65,4% (suco diluído), 59,9% (suco concentrado) e 58,7% (polpa). A polpa manteve-se estável até o 60^o dia (perda de 2,3%). A partir do 120^o ao 270^o dia, houve uma redução de 13,3% e ao 360^o dia redução de 41,3%.

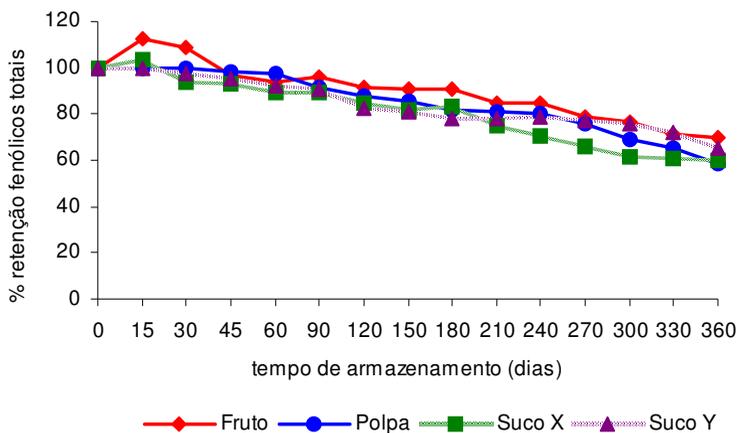


Figura 10. Retenção do conteúdo de fenólicos totais do fruto da *G. brasiliensis* e produtos durante o armazenamento a -15°C .

Valores inferiores no conteúdo de polifenóis foram reportados por Kuskoski et al. (2006) para polpa de amora (118,9 mg GAE/100g), polpa de açaí (136,8 mg GAE/100g), polpa de morango (131,1 mg GAE/100g) e polpa de uva (117,1 mg GAE/100g), armazenados a -15°C .

Entre os sucos, o que obteve menor perda de fenólicos foi o diluído (34,6%) quando comparado com o suco concentrado (40,1%). O suco camarinha diluído manteve-se estável até o 90^o dia, com perda de 9,53%, e a partir do 120^o dia até o 300^o dia, observou-se perda de 13,40 %, enquanto o suco concentrado manteve-se estável até o 60^o dia, com perda de 11,11%. Entretanto, não foram encontrados na literatura científica, para meio de comparação, valores para fenólicos totais e antocianinas em sucos de frutas congelados. Geralmente a indústria de alimentos produz os sucos concentrados e diluídos a partir de tratamento térmico, muitas vezes com adição de aditivos, o que permite comercializá-los a temperatura ambiente.

Assim, as diferenças encontradas nos teores de polifenóis totais e antocianinas em estudos envolvendo frutos e seus produtos podem estar relacionados ao tipo de fruta, processamento, tempo de extração, maturidade, região e prática de cultivo (MALACRIDA; MOTTA, 2005; PELEGRINI et al., 2000).

CONCLUSÃO

Observou-se relação entre a redução do conteúdo de antocianinas, polifenóis, tempo e temperatura de armazenamento. O congelamento mostrou-se como método eficiente para a estabilidade do conteúdo de antocianinas e fenólicos totais do fruto da *G. brasiliensis* e seus produtos. Os resultados indicaram que o fruto da *G. brasiliensis* (camarinha) e seus produtos mantidos sob refrigeração (30 dias) e congelamento (360 dias) são boas fontes de antocianinas e compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS

ANCOS, B.; SHIGENA, M. K.; HAGEN, T. M. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 48, p. 4565-4570, 2000.

BRAMORSKI, A.; CHEREM, A.R.; MEZADRI T.; MELO, S.S.; DESCHAMPS, F.C.; GONZAGA, L.V.; ROCKENBACH, I.I.; FETT, R. Chemical composition and antioxidant activity of *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha) grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2314-2138, 2011.

BUCKOW, R.; KASTELL, A.; TEREFE, N.S.; VERSTEEG, C. Pressure and temperature effects on degradation kinetics and storage stability of total anthocyanins in blueberry juice. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 58, n. 18, 2010.

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

CETKOVIC, G.; BRUNET-CANADANOVIC, J.; DJILAS, S.; SAVATOVIÉ, S.; MANDIÉ, A.; TUMBAS, V. Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. **Food Chemistry**, v. 109, p. 340-347, 2008.

CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanin and polyphenolic composition of fresh and processed cherries. **Journal Food Science**, v. 69, n.1, p. 73-83, 2004.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785p.

CONNOR, A.N.; LUBY, J.J.; HANCOCK, J.F.; BERKHEIMER, S.; HANSON, E.J. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p. 893-898, 2002.

CORDENUNSI, B. R.; GENOVESE, M. I.; NASCIMENTO, J. R. O.; HASSIMOTTO, N. M. A.; SANTOS, R. J.; LAJOLO, F. M. Effects

of temperature on chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. **Food Chemistry**, v. 95, p. 113-121, 2005.

FOLIN, C.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. **Journal of Biology Chemistry**, v.73, p. 627-650, 1927.

FRANCIA-ARICHA, F. M.; GUERRA, M. T.; RIVAS-GONZALO, I. C.; SANTOS-BUELGA, C. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavonols. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p.2262-2266, 1997.

FRANKEL, E. N.; BOSANEK, C. A.; MEYER, A. S.; SILLIMAN, K.; KIRK, L. L. Commercial grape juice inhibits the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 834-838, 1998.

GADELHA, A. J. F.; ROCHA, C. O.; VIEIRA, F. F.; RIBEIRO, G. N. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de abacaxi, acerola, cajá e caju. **Revista Caatinga**, v.22, n. 1, 2009.

GANCEL, A.; FENEUIL, A.; ACOSTA, O.; PÉREZ, A M.; VAILLANT, F. Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). **Food Reserach International**, v. 6, n. 13, 2010.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Journal**, n. 14, v. 3, p. 217-225, 2003.

GONZÁLEZ, E.; BERGOÑA, A.; CANO, M. Relation between bioactive compounds and free radical scavenging capacity in Berry fruits during frozen storage. **Journal Science Food Agriculture**, v.83, p. 722-726, 2003.

HARBORNE, J. .; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.52, p.481-504, 2000.

HARTMANN, A.; PATZ, C.; ANDLAUER, W.; DIETRICH, H.; LUDWIG, M;. Influence of processing on quality parameters of

strawberries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9484-9489, 2008.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulp. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 2928-2935, 2005.

KALT, W.; PRANGE, R. K.; LIDSTER, P. D. Postharvest color development of strawberries: influence of maturity, temperature and light. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 54, p. 541-548, 1993.

KALT, W.; MCDONALD, J. E. Chemical composition of lowbush blueberry cultivar. **Journal American Society of Horticulture Science**, v. 121, p. 142-146, 1996.

KHANAL, R. C.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. **Food Research International**, v. 43, p. 1464-1469, 2010.

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

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, L. S.; LIMA, D. E. S. Polpa congelada de acerola: efeito da temperatura sobre os teores de antocianinas e flavonóis totais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 669-670, 2002.

LORENZI, H.; SARTORI, S. F.; BACHER, L. B.; LACERDA, C. T. M. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas de consumo in natura**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006, p. 137.

MALACRIDA, Cássia R.; MOTTA, Silvana. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 4, n. 24, p. 659-664, 2005.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion Lipid**, v. 16, n. 1, p. 77-84, 2005.

MAZZA, G.; MINATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables and grains**. CRC Press: Boca Raton, 1993. p. 105.

MOURA, E. G. **Agroambientes de transição: entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil**. São Luís: UEMA, 2004.

NARWOJSZI, A.; BOROWSKA, E.J. Cranberry and strawberry juices – influence of method production on antioxidants content and antioxidative capacity. **Polish Journal Nature Science**, v. 25, n. 2, p. 209-214, 2010.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S. T. Chemical stability of açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems. **Food Chemistry** v. 118, p. 17-25, 2010.

PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocyanins: from plants to health. **Phytochemistry Review**, n. 7, p. 281-299, 2008.

PELEGRINI, N.; SIMONETTI, P.; GARNADA, C.; BRENA, O.; BRIGHENTI, F.; PIETTA, G. Polyphenol content and total activity of *Vini Novelli* (young red wines). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 732-735. 2000.

SCIBISZ, I.; MITEK, M. The changes of antioxidants properties in highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during freezing and long-term frozen storage. **Acta Scientiarum Polonorum Technology Alimentar**, v. 6, n. 4, p. 75-82, 2007.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolics compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 50, p. 2432-2438, 2002.

SVILAAS, A.; SAKHI, A. K.; ANDERSEN, L. F.; SVILAAS, E. C.; STRÖM, D. R.; BLOMHOFF, R.; LEIV, O. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 562-567, 2004.

TORREGGIANI, D. FORNI, E.; GUERCILENA, I.; MAESTRELLI, A.; BERTOLO, G.; ARCHER, G P.; KENNEDY, C.J.; BONE, S.; BLOND, G.; CONTRERAS-LOPEZ, E.;

CHAMPION, D. Modification of glass transition temperature through carbohydrates additions: effect upon colour and anthocyanin pigment stability in frozen strawberry juices. **Food Research International**, v.32, p. 441–446, 1999.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000.

WANG, W.D.; XU, S.Y. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 271–275, 2007.

ZHANG, D.; QUANTICH, P. C.; GRIGOR, J. M. Changes in phenolic compounds in Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit during postharvest storage. **Postharvest Biology Technology**, v. 19, p.165-172, 2000.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES

Este estudo mostrou que os frutos da *G. brasiliensis* apresentou elevado conteúdo de fibras alimentares, alta concentração de antocianinas monoméricas e de compostos fenólicos. Embora outros estudos sejam necessários, os dados obtidos neste trabalho revelaram que o fruto da *G. brasiliensis* apresenta importante atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*.

Os animais expostos ao agente estressor (MMS) que receberam o suco do fruto da camarinha mostraram, através do restabelecimento da atividade enzimática, da diminuição da peroxidação lipídica e da arquitetura hepática, resultados indicativos de proteção ao estresse oxidativo.

O congelamento mostrou ser o método de conservação mais eficiente para a estabilidade do fruto da *G. brasiliensis* e seus produtos, por mostrarem as maiores proporções de retenção de compostos fenólicos e antocianinas.

Considerando que o fruto da *G. brasiliensis* e seus produtos são boas fontes de substâncias antioxidantes, demonstrado por testes *in vitro* e *in vivo*, sugere-se estudos adicionais que possam elucidar tais mecanismos:

Analisar a atividade citotóxica e citoprotetora contra o estresse oxidativo causado por H_2O_2 ;

Avaliar a proteção gênica contra o estresse oxidativo causado por H_2O_2 em ensaio cometa, utilizando células;

Avaliar a proteção gênica em DNA de plasmídio pBSK II frente à exposição dos radicais H_2O_2 / AAPH.

Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade do extrato do fruto e outras partes da planta da *G. brasiliensis* em células eucarióticas de *Saharomyces cerevisiae*;

Estudar o efeito agudo e crônico do fruto e outras partes da *G. brasiliensis* utilizando como modelo de hepatotoxicidade o tetacloro de carbono;

ANEXOS

ANEXO A – Pôster comentado no XXI Congresso Brasileiro de Nutrição, I Congresso Ibero-Americano de Nutrição, I Simpósio Latino-Americano de Nutrição Esportista – COBRAN 2010

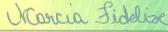


CONBRAN 2010
XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO
I CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO
I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ESPORTIVA

Certificado

Certificamos que
ADRIANA BRAMORSKI, KAREN CAROLINE DE ANDRADE, MARIANA RODRIGUES REGIANINI, JOCILENE JURCEVIC,
JESSYKA MONALISA BELOTTO e BIANCA DE SOUZA ARALDI
participaram da realização do trabalho
"ESTUDO DA ESTABILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTOCIANINAS DA AMORA-PRETA (MORUS NIGRA
L.) SOB CONGELAMENTO"
apresentado como PÔSTER COMENTADO durante o
CONBRAN 2010 - XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO,
I CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO e
I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ESPORTIVA
realizados em Joinville-SC
no período de 26 a 29 de maio de 2010.


Paulo Luiz Viteritte
Presidente da Comissão Científica


Marcia Fidelix
Presidente da ASBRAN
Associação Brasileira de Nutrição

ANEXO B - Artigo completo publicado. “Chemical composition and antioxidant activity of *Gaylussacia brasiliensis* (*camarinha*)” grown in Brazil. Food Research International (2010), doi:10.1016/j.foodres.2010.09.033



Chemical composition and antioxidant activity of *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha) grown in Brazil

Adriana Bramorski^{a,b,*}, Adriana da Rosa Cherem^b, Tatiana Mezadri^b, Sandra Soares Melo^b,
Francisco Carlos Deschamps^{b,c}, Luciano Valdemiro Gonzaga^a, Ismael Ivan Rockenbach^a, Roseane Fett^a

^a Department of Food Science and Technology, Center of Agricultural Science, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^b Center of Sciences of the Health, Course of Nutrition, University of the Valley of Itajaí, Itajaí, Santa Catarina, Brazil

^c Research Agricultural Rural Extension of Santa Catarina, Itajaí, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2010

Accepted 27 September 2010

Keywords:

Gaylussacia brasiliensis (camarinha)

Food chemistry

Phenolic compounds

Antioxidant capacity

ABSTRACT

This paper presents the centesimal and mineral composition, fatty acid profile of the lipidic fraction, phenolic and anthocyanin contents, and antioxidant activity of *Gaylussacia brasiliensis* fruit. The results indicated the following composition: moisture (81.30%), lipids (0.62%), proteins (0.56%), carbohydrates (10.74%), dietary fiber (6.53%), and ash (0.25%). The main elements comprising the mineral composition were K, Mg, Ca, and Fe. The fatty acid composition was characterized by a high content of polyunsaturated fatty acids (62.2%) and a high PUFA/SFA ratio (2.92). The *G. brasiliensis* fruit contained considerable amounts of phenolics (492.87 mgAG/100 g) and anthocyanins (240.43 mg/100 g), which contribute to its high antioxidant activity. This study highlights the potential of this fruit as an important source of both nutritional and bioactive compounds available in the native Brazilian flora.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**ANEXO C - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO E O ARTIGO
SUBMETIDO PARA APRECIÇÃO PELA REVISTA BASIC
OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY**

Manuscript title: Effect of *Gaylussacia brasiliensis* juice on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity against liver damage in rats.

Dear Professor Bramorski

Thank you very much for submitting the above manuscript to Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. The manuscript is being evaluated and we will contact you as soon as a decision has been made.

The progress of your manuscript can be followed from the progress report accessed from your overview at any time during the review or publication process.

Please ONLY inform us by return of email if the pdf version of your article accessed from the progress report, DOES NOT correspond with the version that was submitted.

The editorial office

Quick login link:

http://www.manuscriptmanager.com/mm3/quicklog.php?pw=bcpt*44*adrianaunivali@yahoo.com.br*65f5e

If the above link is inactive, your login details to the system are below:

Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology

University of Southern Denmark

Winslowparken 19

Odense

DK 5000

Denmark

bcpt@manuscriptmanager.com

**ANEXO D – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA E
PESQUISA DA UNIVALI PARA USO DE ANIMAIS**



UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAI

Condições para realização	Adequadas
Experiência prévia com manuseio de animais	Sim
Orientador	Adequado
Acadêmicos	Adequado
Justificativa do projeto	Adequada
Revisão e referências bibliográficas sobre o assunto	Adequada
Metodologia	Situação
Delimitação experimental	Adequado
Adequação do modelo experimental	Adequado
Tamanho total da amostra	36
Número amostral por grupo	06
Justificativa do tamanho da amostra	Adequado
Manutenção e bem estar animal	Adequado
Citação de referências sobre metodologia	Adequado
Avaliação dos dados – estatística	Adequada - quantitativa
Cronograma	Adequado
Data de início prevista	Julho/08
Data de término prevista	Dezembro/08

Parecer
APROVADO

Comentários Gerais sobre o Projeto

Relator: Membro CEP/UNIVALI

Prof. Darlene Camati Persuhn
Coordenadora CEP/UNIVALI