

COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES EM AMORA-PRETA (*Rubus* spp.)¹

DANIELA SOUZA FERREIRA², VERIDIANA VERA DE ROSSO³,
ADRIANA ZERLOTTI MERCADANTE⁴

RESUMO-A amora-preta (*Rubus* spp.), pequena fruta de clima temperado, possui coloração atraente, variando do vermelho púrpura ao azul, devido ao elevado teor de antocianinas. As antocianinas, juntamente com os carotenoides, compõem os pigmentos naturais, majoritários encontrados em diversas frutas. Diversos estudos têm relatado a importância destes pigmentos naturais, como protetores e/ou inibidores de doenças degenerativas, porém são escassos os estudos sobre compostos bioativos presentes em amora-preta cultivada no Brasil. Os objetivos do presente estudo foram identificar as antocianinas e os carotenoides presentes em amora-preta, determinar os conteúdos totais de compostos fenólicos, carotenoides, flavonoides, antocianinas totais, monoméricas, poliméricas e copigmentadas, e a capacidade antioxidante frente aos radicais livres ABTS e DPPH. O teor total de carotenoides foi baixo ($86,5 \pm 0,2 \mu\text{g}/100 \text{ g}$), com all-*trans*- β -caroteno (39,6 %) e all-*trans*-luteína (28,2 %) como os majoritários. As amoras-pretas apresentaram elevado potencial antioxidante, principalmente pelo teor representativo de antocianinas monoméricas ($104,1 \pm 1,8 \text{ mg}/100 \text{ g}$ de fruto), presença de antocianinas poliméricas ($22,9 \pm 0,4 \%$), baixa porcentagem de antocianinas copigmentadas ($1,6 \pm 0,1 \%$) e altos teores de compostos fenólicos ($241,7 \pm 0,8 \text{ mg}$ equivalente de ácido gálico/100 g) e de flavonoides totais ($173,7 \pm 0,7 \text{ mg}$ equivalente de catequina/100 g). Cianidina 3-glucosídeo foi a antocianina majoritária (92,9 %). Diante destes resultados, a amora-preta pode ser considerada uma fonte natural rica em antioxidantes e pigmentos.

Termos para indexação: pigmentos, antocianinas, compostos fenólicos, carotenoides, atividade antioxidante.

BIOACTIVE COMPOUNDS OF BLACKBERRY FRUITS (*Rubus* spp.) GROWN IN BRAZIL

ABSTRACT -The blackberry (*Rubus* spp.), a small fruit that grows in temperate climate, shows an attractive color ranging from purple red to blue, due to the high content of anthocyanins. The anthocyanins, along with carotenoids, are the major natural pigments found in several fruits. Many studies have reported the importance of these natural pigments as protectors and, or, inhibitors of degenerative disorders; however, data regarding the bioactive compounds in blackberry cultivated in Brazil are rare. Thus, the objectives of the present study were to identify the anthocyanins and carotenoids in blackberry (*Rubus* spp.), to determine the total contents of phenolic compounds, flavonoids, carotenoids, and total, monomeric, polymeric and co-pigmented anthocyanins, and the antioxidant capacity against the free radicals ABTS and DPPH. The total carotenoids level was low ($86.5 \pm 0.2 \mu\text{g}/100 \text{ g}$), with all-*trans*- β -carotene (39.6 %) and all-*trans*-lutein (28.2 %) as the major ones. The blackberries showed high antioxidant status mainly due to the high level of monomeric anthocyanins ($104.1 \pm 1.8 \text{ mg}/100 \text{ g}$ of fruit), presence of polymeric anthocyanins ($22.9 \pm 0.4 \%$), low percentage of co-pigmented anthocyanins ($1.6 \pm 0.1 \%$) and high contents of phenolic compounds ($241.7 \pm 0.8 \text{ mg}$ Gallic acid equivalent/100 g) and total flavonoids ($173.7 \pm 0.7 \text{ mg}$ catechin equivalent/100 g). Cyanidin 3-glucoside was the major anthocyanin (92.9 %). These results indicate that the blackberry cultivated in Brazil can be considered a rich natural source of antioxidants and pigments.

Index terms: pigments, anthocyanins, phenolic compounds, carotenoids, antioxidant activity.

¹(Trabalho 190-09). Recebido em: 14-08-2009. Aceito para publicação em: 10-02-2010.

²Eng. de Alimentos, Mestre em Ciência de Alimentos pela Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, E-mail: danisf@fea.unicamp.br

³Eng. de Alimentos, Dra., Professora adjunta do curso de Nutrição da Faculdade Federal de São Paulo, Santos - SP, E-mail : veriderosso@yahoo.com

⁴Eng. de Alimentos, Dra., Professora Associada do Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6121 - Campinas - SP - Brasil; E-mail: azm@fea.unicamp.br

INTRODUÇÃO

A amora-preta (*Rubus* spp.) pertence à família Rosaceae, gênero *Rubus*, formando um grupo diverso e bastante difundido, para o qual se estima existir entre 400 a 500 espécies, conhecidas como *berries*, cujo termo vem sendo usado comumente para descrever qualquer fruta pequena, de sabor adocicado e formato arredondado (JEPSON; CRAIG, 2005), incluindo framboesas e amoras-pretas cultivadas na América, Europa, África e Ásia (LORENZI et al., 2006).

A amoreira-preta é uma planta rústica, de clima temperado, cujo cultivo vem crescendo em diversas regiões do Brasil. Além do Rio Grande do Sul, há plantio de amora-preta no sul de Minas Gerais, na região de Jundiá em São Paulo, Curitiba no Paraná e em Palmas em Santa Catarina (ANTUNES et al., 2006). A amoreira-preta possui grande aceitação pelos produtores, devido ao baixo custo de implantação e produção, facilidade de manejo e uso reduzido de defensivos agrícolas. Além do consumo *in natura*, o grande mercado para produtos de amora-preta é gerado a partir do suco clarificado e concentrado, usado como base na elaboração de uma vasta gama de produtos, como caldas para sorvetes, geleias, xaropes, bebidas alcoólicas, refrescos e misturas com sucos de outras frutas (ANTUNES et al., 2003). Através de um programa de melhoramento genético para adaptação ao clima e consumo no Brasil, várias cultivares foram desenvolvidas pela Embrapa Clima Temperado, dentre as quais a mais comercializada no Brasil atualmente é a Tupy, e em menor escala, Guarani e Brazos.

Vários compostos lipofílicos e hidrofílicos são encontrados em *berries*, cujas propriedades biológicas têm sido atribuídas aos altos níveis e ampla diversidade de compostos fenólicos. Porém, acredita-se que o efeito complementar, aditivo e/ou sinérgico resultante dos diversos componentes seja o responsável pelas propriedades biológicas benéficas ao invés de uma única classe ou composto químico. Por este motivo, as *berries* têm sido fonte de extensivos estudos, incluindo a realização de um simpósio internacional dedicado exclusivamente a estas frutas, iniciado em 2005 nos Estados Unidos.

Além dos compostos fenólicos, podem-se destacar os pigmentos naturais, antocianinas e os carotenoides, presentes nestas frutas. O efeito protetor destes compostos tem sido relacionado ao seu poder antioxidante, pois os compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, possuem a capacidade de doar hidrogênios ou elétrons aos radicais livres (RICE-EVANS et al., 1996), já os carotenoides são considerados excelentes desativadores de oxigênio

singleto (DI MASCIO et al., 1989).

Teores de antocianinas de 70 a 201 mg/100 g PF (peso fresco) foram reportados em 18 diferentes cultivares de amoras-pretas (*Rubus* spp.) dos Estados Unidos, França, Macedônia, Chile e México (FANCHIANG; WROLSTAD, 2005). As cultivares de amoras-pretas (*R. eubatus*) Cainguangue, Brazos, Tupy, Guarani e Seleção 97, da Estação Experimental (EPAMIG/FECD) de Minas Gerais (Brasil), apresentaram 116 a 194 mg de antocianinas/100 g PF, 123 a 233 mg de flavonoides totais/100 g PF e 373 a 499 mg de compostos fenólicos/100 g PF (HASSIMOTO et al., 2008). Sete cultivares de *R. fruticosus* da Itália apresentaram valor médio de $289,3 \pm 55,8$ mg de compostos fenólicos totais/100 g PF (BENVENUTI et al., 2004) e Marinova e Ribarova (2007) encontraram 440 µg de carotenoides/100 g PF de amora-preta para esta espécie, porém cultivada na Bulgária.

Considerando que a composição de pigmentos minoritários da amora-preta ainda não foi investigada, o presente trabalho teve por objetivos avaliar a composição de antocianinas e de carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-PDA-MS/MS), além de verificar o potencial funcional da amora-preta cultivada no Brasil, determinando as diferentes formas de antocianinas (totais, monoméricas, poliméricas e copigmentadas), compostos fenólicos totais, flavonoides totais e a capacidade antirradical livre.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução deste trabalho, foram adquiridos dois lotes de 10 kg de amoras-pretas (*Rubus* spp.), cultivar Tupy, no CEASA de Campinas, no período da safra, entre novembro e dezembro de 2006. Os frutos inteiros foram armazenados em ultrafreezer a -60 °C.

Os compostos bioativos foram quantificados em espectrofotômetro de absorção UV-visível de arranjo de diodos (modelo 8453, Agilent).

As análises de carotenoides e antocianinas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, com sistema de bombeamento quaternário (modelo LC-20AD, Shimadzu), com válvula injetora Rheodyne, com alça de amostra de 20 µL, conectado a um desgaseificador e acoplado em série a um detector de arranjo de diodos (PDA) (modelo SPD-M20A, Shimadzu,) e um espectrômetro de massas com analisador ion trap (MS/MS), modelo Esquire 4000 (Bruker Daltonics), com fontes de ionização "eletronspray ionization" (ESI) e "atmospheric pressure chemical ionization" (APCI).

Os compostos fenólicos foram extraídos

segundo o método de Kim et al. (2003). Cerca de 10 g de amora-preta foram homogeneizadas com metanol:água (8:2) em ultrassom, por 20 minutos, seguido de filtração em funil de Buchner e lavagem exaustiva com metanol. Os filtrados foram combinados e concentrados em um evaporador rotatório (< 40 °C) até cerca de 100 mL. Esta solução foi centrifugada por 20 min e armazenada em freezer (-36 °C) para a realização das análises de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antirradical livre. As extrações foram realizadas em duplicata.

A determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, utilizando 1 mL da solução armazenada a -36 °C ou das soluções-padrão de ácido gálico (0,01; 0,04; 0,07; 0,10 e 0,13 mg/mL), segundo Singleton e Rossi (1965). Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g PF de amora-preta. Os flavonoides totais foram determinados segundo Zhishen et al. (1999), e o teor, expresso em mg equivalente de catequina (CE)/100 g PF de amora-preta. Estas análises foram realizadas em triplicata.

A quantificação de antocianinas totais foi realizada segundo o método descrito por Francis (1982). As amoras trituradas (10 g) foram misturadas com etanol 95 %/HCl 1,5N (85:15) em homogeneizador (Metabo). A mistura foi armazenada na ausência de luz, a 4 °C, por 16 horas, seguido de filtração a vácuo e lavagem exaustiva com etanol acidificado. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-visível a 535 nm. A extração foi realizada em duplicata. Para o cálculo do teor de antocianinas totais, foi utilizado o coeficiente de absorvidade de 982 para groselha.

A determinação de antocianinas monoméricas foi realizada segundo Lee et al. (2005). Uma quantidade de 10 g de amora triturada foi extraída exaustivamente com solução metanólica acidificada com HCl a 1 %, em homogeneizador. As soluções foram misturadas e concentradas em evaporador rotatório (T < 38 °C) até evaporação do metanol, obtendo-se desta forma o extrato bruto de antocianinas (utilizado para identificação e determinação de antocianinas monoméricas, copigmentadas e poliméricas). Os resultados foram expressos como mg de cianidina 3-glucosídeo por 100 g de fruta, utilizando coeficiente de extinção molar de 26.900 (JURD; ASEN, 1966). A extração foi realizada em duplicata.

Para a determinação de antocianinas poliméricas, foi aplicado o método descrito por Mazza et al. (1999) e Gutiérrez (2003). O extrato bruto antocianínico diluído foi ajustado a pH 3,6 e centrifugado. Foram adicionados 20 µL de acetaldeído 10 % a 2 mL de

extrato e após encubação por 45 min sob ausência de luz, foi realizada leitura da absorbância a 520 nm (A_{acet}). Em outra alíquota de 2 mL do extrato, foram adicionados 260 µL de bissulfito de sódio a 5 %, e a absorbância A_{SO_2} foi medida também a 520 nm. Para antocianinas totais, foi considerada a absorbância do extrato diluído a 520 nm (A_{dil}). Estas análises foram realizadas em triplicata, e a distribuição em porcentagem de antocianinas copigmentadas, monoméricas e poliméricas foi obtida através das equações 1; 2 e 3, respectivamente:

$$\% \text{copigmentadas} = \frac{A_{\text{acet}} - A_{\text{dil}}}{A_{\text{acet}}} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

$$\% \text{monoméricas} = \frac{A_{\text{dil}} - A_{\text{SO}_2}}{A_{\text{acet}}} \times 100 \quad (\text{eq. 2})$$

$$\% \text{poliméricas} = \frac{A_{\text{SO}_2}}{A_{\text{acet}}} \times 100 \quad (\text{eq. 3})$$

A identificação das antocianinas foi realizada por HPLC-PDA-MS/MS, de acordo com De Rosso e Mercadante (2007a). A separação de antocianinas foi realizada em coluna C_{18} Shim-pack CLC-ODS, com diâmetro interno de 4,6 mm e comprimento de 250 mm, partículas de 5 µm (Shimadzu), usando como fase móvel um gradiente linear de ácido fórmico a 5 %/metanol de 85:15 para 20:80 em 25 min, mantendo esta proporção por 15 min, com fluxo a 0,9 mL/min e temperatura de 25 °C. Os cromatogramas foram processados a 520 nm, e os espectros, obtidos entre 250 e 600 nm. As antocianinas foram identificadas através das características dos espectros UV-visível e de massas, comparando com padrões e dados da literatura (SELLAPPAN et al., 2002; FAN-CHIANG; WROLSTAD, 2005; WU; PRIOR, 2005; ZANATTA et al., 2005; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007a).

A extração de carotenoides de amora-preta (20 g) foi realizada exaustivamente com acetona, de acordo com De Rosso e Mercadante (2007b). Em seguida, foi realizada saponificação com uma solução de KOH a 10 % em metanol, para hidrolisar os ésteres de xantofilas. O extrato obtido foi concentrado até securo em rota-evaporador (< 35 °C). A extração de carotenoides foi realizada em duplicata. O teor de carotenoides totais foi determinado em espectrofotômetro a 450 nm em éter de petróleo, e o resultado, expresso em termos de β-caroteno, utilizando absorvidade de 2.592 (BRITTON, 1995).

A separação e a identificação de carotenoides por HPLC-PDA-MS/MS foi realizada segundo De Rosso e Mercadante (2007b), em coluna C_{30} YMC (3 µm, 250 x 4,6 mm i.d., Waters), empregando como fase móvel um gradiente linear de metanol/

éter metil *tert*-butílico (TBME) de 95:5 para 70:30 em 30 min, para 50:50 em 20 min, e mantendo esta proporção por 35 min, com fluxo de 0,9 mL/min e temperatura da coluna a 22 °C. Os espectros UV-visível foram obtidos entre 250 e 600 nm, e os cromatogramas foram processados a 450 nm. Os carotenoides foram identificados considerando a seguinte combinação de informações: ordem de eluição, cocromatografia com padrões, características dos espectros UV-visível ($\lambda_{\text{máx}}$, estrutura fina, intensidade do pico *cis*) e de massas comparados com dados da literatura (BRITTON, 1995; MARINOVA; RIBAROVA, 2007; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007a; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007b).

A atividade antirradical livre dos extratos de amora-preta foi determinada frente aos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS⁺ (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) no extrato de compostos fenólicos totais, enquanto o efeito antirradical dos extratos de antocianinas monoméricas, poliméricas e totais foi analisado com o radical ABTS. Utilizou-se o método DPPH[•], segundo Brand-Willians et al. (1995). A atividade antioxidante foi expressa pelo coeficiente EC₅₀, definido como a quantidade necessária do composto antioxidante para o decréscimo de 50 % da concentração inicial do radical DPPH. Utilizou-se o método de ABTS, segundo Re et al. (1999), com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) como referência para a determinação da capacidade antioxidante equivalente em Trolox (TEAC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição de Pigmentos

O perfil de antocianinas da amora-preta está apresentado na Figura 1. A identificação e as características dos picos estão apresentadas na Tabela 1. O espectro UV-visível do pico 1 mostrou $\lambda_{\text{máx}}$ a 519 nm, característica de derivados de cianidina ou peonidina, enquanto o íon molecular [M]⁺ a *m/z* 449 e o fragmento do MS/MS a *m/z* 287 correspondem à massa molecular da aglicona cianidina, como resultado da perda neutra de uma hexose com 162 unidades de massa atômica (u). A identificação do açúcar ligado à aglicona foi confirmada como sendo glucose por coeluição com padrão de cianidina 3-glucosídeo. A cianidina 3-rutinosídeo (pico 2) apresentou íon molecular a *m/z* 595 e dois fragmentos a 287 e 449 u, o primeiro fragmento correspondendo à aglicona cianidina, como resultado da perda de rutinose (308 u), e o fragmento a *m/z* 449 correspondendo à aglicona cianidina mais

uma molécula de hexose, como o resultado da perda de uma desóxi-hexose [M-146]⁺. O pico 2 foi definitivamente identificado como cianidina 3-rutinosídeo por coeluição por HPLC com padrão. Os picos 3 e 4 foram identificados como derivados acilados da cianidina 3-glucosídeo. Considerando os espectros UV-visível e os íons moleculares, os picos 3 e 4 foram identificados como cianidina 3-malonil-glucosídeo e cianidina 3-dioxalil-glucosídeo, respectivamente.

Cianidina 3-glucosídeo foi encontrada como a antocianina majoritária na amora-preta, com 92,9 % do total de antocianinas. O perfil de antocianinas encontrado neste estudo é compatível com os reportados na literatura para amora-preta (WU; PRIOR, 2005), onde cianidina 3-glucosídeo também foi a majoritária (88,6 a 95,2 %).

O perfil de carotenoides presente em amora-preta pode ser visualizado no cromatograma apresentado na Figura 2, e a identidade e as características dos carotenoides separados estão apresentadas na Tabela 2. A identificação do pico 2 como *all-trans*-luteína foi realizada considerando o espectro UV-visível característico, espectro de massas com a molécula protonada a *m/z* 569 e fragmentos devido à perda de grupos hidroxilas a *m/z* 551 [M + H - 18]⁺ e 533 [M + H - 18 - 18]⁺. Além disso, o MS/MS mostrou a presença do fragmento a *m/z* 477, resultante da perda de tolueno ([M + H - 92]⁺) da cadeia poliênica e a *m/z* 459 devido à perda consecutiva de hidroxila e tolueno. Uma característica da luteína foi a maior intensidade do fragmento de 551 u que o da molécula protonada (569 u), devido à presença de uma hidroxila alílica à ligação dupla no anel ϵ - (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007b). A coeluição com padrão de *all-trans*-luteína confirmou a identificação do pico 2. O pico 3 foi identificado como *all-trans*-zeaxantina considerando as características dos espectros UV-visível e de massas, e confirmado por coeluição com padrão de *all-trans*-zeaxantina. Como esperado, o espectro de massas apresentou a molécula protonada em *m/z* 569 e fragmentos a *m/z* 551 [M + H - 18]⁺ e 533 [M + H - 18]⁺. A maior intensidade do pico da molécula protonada (569 u), comparada com a do fragmento a *m/z* 551, indicou que a hidroxila não está em posição alílica à ligação dupla, em contraste ao observado para luteína.

O pico 4a foi identificado como 5,6-epóxi- β -criptoxantina, considerando $\lambda_{\text{máx}}$ 6 nm menor que a β -criptoxantina e estrutura fina espectral maior. O espectro de massas apresentou molécula protonada a *m/z* 569 e fragmentos a *m/z* 551, devido à perda do grupo hidroxila, e a *m/z* 221, indicando que o epóxido está ligado ao anel β com o grupo hidroxila no carbono 3.

O pico 4b foi identificado como fitoeno, considerando os espectros UV-visível ($\lambda_{\text{máx}}$ e estrutura fina) e de massas. O espectro de massas apresentou a molécula protonada a m/z 545 e íon mais abundante a m/z 339 no espectro MS/MS, correspondendo à clivagem da ligação alílica próxima à conjugação dos trienos. Entretanto, assim como em outras frutas, não foi possível identificar a isomeria *cis-trans* (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007b), porém cabe destacar que 15-*cis*-fitoeno é abundante em plantas verdes e na maioria dos microrganismos. Os picos 5 e 6 foram identificados, respectivamente, como 13-*cis*- ou 13'-*cis*- β -criptoxantina e all-*trans*- β -criptoxantina. Como esperado para os isômeros *cis* e *trans*, os espectros de MS foram similares, com a molécula protonada detectada a m/z 553 e fragmentos menos intensos a m/z 535 $[M + H - 18]^+$ e 461 $[M + H - 92]^+$, resultado da perda do grupo hidroxila e tolueno, respectivamente. A identificação foi confirmada por co-eluição com padrão all-*trans*- β -criptoxantina e, no caso do isômero *cis*, pela sua menor estrutura fina e presença do pico *cis* característico, além da ordem de eluição em coluna C_{30} em relação ao isômero all-*trans* (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007ab).

Os picos 7; 9 e 10 foram identificados como 13-*cis*-, all-*trans* e 9-*cis*- β -caroteno, respectivamente, considerando as características dos espectros UV-visível, o comportamento cromatográfico, coeluição com padrões e espectros de massas. Os dois isômeros *cis* apresentaram menor estrutura fina e presença do pico *cis*. Todos os isômeros apresentaram a molécula protonada em m/z 537 e fragmento no MS/MS a m/z 444 $[M - 92]^+$, correspondendo à perda do tolueno da cadeia poliênica. O pico 8 foi identificado como all-*trans*- α -caroteno, apresentando o mesmo cromóforo que a luteína e, portanto, o espectro UV-visível foi similar ao desta xantofila. A identificação foi confirmada através do comportamento cromatográfico, coeluição com padrão de all-*trans*- α -caroteno, e espectro de massas. O espectro de massas apresentou a molécula protonada a m/z 537, e fragmentos a m/z 444, correspondendo à perda do tolueno, e a m/z 481 característica do α -caroteno.

Assim como reportado em outros estudos com frutas vermelhas (HEINONEN et al., 1989; MARINOVA; RIBAROVA, 2007), os carotenoides majoritários encontrados em amora-preta foram all-*trans*- β -caroteno e all-*trans*-luteína, perfazendo 39,6 % e 28,2 % do total, respectivamente.

Teores de compostos bioativos

O alto teor de compostos fenólicos totais encontrado em amora-preta no presente estudo (Tabela 3) também foi reportado por diversos autores para amoras de cultivares diferentes encontradas

nos Estados Unidos, Brasil e Itália, com valores na faixa de 192,8 a 499,0 mg GAE/100 g (WANG; LIN, 2000; SELLAPPAN et al., 2002; BENVENUTI et al., 2004; HASSIMOTTO et al., 2008; WANG et al., 2008). Foi encontrado também um alto teor de flavonoides totais (Tabela 3), resultado este dentro da faixa de concentração de flavonoides encontrada para amoras de diferentes cultivares brasileiras, 123,3 a 213,3 expressos em mg da aglicona (quercetina, cianidina ou epicatequina) por 100 g de PF de fruto (HASSIMOTTO et al., 2008). Entretanto, valores maiores ($265,7 \pm 11,5$ mg CE/100 g) foram reportados em amora cultivar Kiowa dos Estados Unidos (SELLAPPAN et al., 2002).

O teor de antocianinas monoméricas encontrado no presente estudo (Tabela 3) está dentro da ampla faixa de 67,4 a 248,0 mg cianidina 3-glicosídeo/100 g PF reportada para diversas espécies e cultivares de amoras (WANG; LIN, 2000; SELLAPPAN et al., 2002; BENVENUTI et al., 2004; FANCHIANG; WROLSTAD, 2005; HAGER et al., 2008; WANG et al., 2008). Esta ampla variação nos teores de antocianinas de amoras deve-se a possíveis efeitos das condições climáticas da região cultivada, estágio de maturação, espécie e cultivar. Para a cultivar brasileira Tupy, Hassimotto et al. (2008) encontraram o valor de $116,0 \pm 2,0$ mg cianidina 3-glicosídeo/100 g de fruto.

A partir do método proposto por Francis (1982), obteve-se menor teor de antocianinas totais em comparação ao de antocianinas monoméricas, como pode ser observado na Tabela 3. O coeficiente proposto para o cálculo por Francis (1982) refere-se ao suco de groselha em etanol acidificado, cuja antocianina majoritária é peonidina 3-galactosídeo, seguida da cianidina 3-galactosídeo (WU; PRIOR, 2005), o que pode explicar esta diferença no teor antocianínico obtido por diferentes métodos. Outra hipótese é que o solvente utilizado no método de Francis (1982) não garante a total extração de antocianinas, pois o metanol é 20 % mais eficiente que o etanol e 73 % mais eficiente que a água, em termos de extração de antocianinas (METIVIER et al., 1980).

O teor de antocianinas monoméricas ($76,2 \pm 0,3$ %) e poliméricas ($22,9 \pm 0,4$ %) encontrado neste estudo está dentro do esperado para amostras com elevado conteúdo de antocianinas, como previsto para sucos e vinhos (9,2 a 36,0 % poliméricas) (HAGER et al., 2008; MAZZA et al., 1999). Como esperado, o resultado obtido para antocianinas copigmentadas, $1,6 \pm 0,1$ %, não foi representativo comparando com valores obtidos em vinho de uvas *Cabernet Franc*, *Merlot* e *Pinot Noir* (32,4 a 51,6 %) reportados por Mazza et al. (1999). No presente es-

tudo, a copigmentação foi induzida com acetaldeído, porém é um fenômeno que ocorre naturalmente, no qual pigmentos e outros compostos orgânicos não coloridos formam associações ou complexos principalmente durante fermentação (GUTIÉRREZ, 2003).

O teor de carotenoides totais de amora-preta encontrado neste estudo (Tabela 3) foi 3 a 5 vezes menor que os teores reportados para outras frutas vermelhas, tais como ameixa, groselha-preta, mirtilo, framboesa (HEINONEN et al., 1989; MARINOVA; RIBAROVA, 2007) e principalmente, menor em relação a frutas amarelas consideradas fontes de carotenoides, como buriti, abricó, marimari, pupunha, physalis e tucumã, provenientes da Amazônia (60 a 500 vezes) (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007b).

Atividade antirradical livre

Os pigmentos antociânicos são conhecidos como efetivos sequestradores de radicais livres e quelantes de metais, e um grande número de investigações tem reportado alta correlação entre o conteúdo total de antocianinas e atividade antioxidante (HASSIMOTTO et al., 2008; SELLAPPAN et al., 2002). Vários outros componentes fitoquímicos, como fenilpropanol e ácidos fenólicos, são também conhecidos por sua capacidade antioxidante em frutas e vegetais.

O método ABTS foi utilizado com os extratos obtidos para os compostos fenólicos totais (80% metanol), antocianinas totais (etanol/HCl 85:15), monoméricas (1% HCl em metanol) e poliméricas e copigmentadas (metanol pH 3,6), apresentando valores em uma faixa de 946,5 a 2.209,6 mM TEAC/100 g de amora-preta (Tabela 4). Sellappan et al. (2002)

relataram atividade antioxidante dentro desta faixa (2035,0 ± 32,5 mM TEAC/100 g). Entretanto, o teor obtido neste estudo pelo método DPPH (Tabela 4) foi 5 vezes maior que o apresentado por Benvenuti et al. (2004) para amoras desenvolvidas no sul da Itália (6,4 ± 1,7 mg/mg DPPH). Além disso, estes valores estão dentro da faixa de 50,0 a 25.280,0 mM TEAC/100 g para diversas frutas tropicais brasileiras com elevado potencial antioxidante (BARRETO et al., 2009).

Como esperado, o extrato de compostos fenólicos apresentou a maior atividade antirradical ABTS, devido à correlação direta entre compostos fenólicos e capacidade antirradical livre (KIM et al., 2003; BENVENUTI et al., 2004; SELLAPPAN et al., 2002).

Além dos compostos fenólicos, vários compostos fitoquímicos, incluindo flavonoides, são conhecidos pela capacidade antioxidante em frutas e vegetais (RICE-EVANS et al., 1996). No presente estudo, foi demonstrado que as antocianinas possuem papel fundamental como antioxidantes naturais nesta fruta, representando em torno de 65 % da atividade antirradical livre dos compostos fenólicos totais. De fato, Hassimotto et al. (2008) observaram correlação linear entre os teores de cianidina e capacidade antioxidante em cinco cultivares de amora. Além disso, a cianidina 3-glucosídeo, antocianina majoritária em amora-preta, também foi citada como responsável pela atividade antioxidante nestas frutas (WANG et al., 2008), e por sua eficiência em prevenir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade em humanos (SATUÉ-GRACIA et al., 1997).

TABELA 1-Características cromatográficas e espectroscópicas de antocianinas de amora-preta, obtidas por HPLC-PDA-MS/MS.

Pico ^a	t _R (min)	λ _{max} (nm) ^b	[M] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)	Compostos
1	12,2	280, 519	449	287[M-162]	Cianidina 3-glucosídeo
2	12,8	280, 522	595	449[M-146] 287[M-146-162]	Cianidina 3-rutinosídeo
3	15,4	280, 522	535	287[M-248]	Cianidina 3-malonil-glucosídeo
4	16,0	281, 523	593	287[M-306]	Cianidina 3-dioxalil-glucosídeo

^a Numerado de acordo com o cromatograma mostrado na Figura 1.

^b Gradiente linear metanol/ácido fórmico 5 %.

TABELA 2 - Características cromatográficas e espectroscópicas de carotenoides de amora-preta, obtidas por HPLC-PDA-MS/MS.

pico ^a	carotenóide	t _R (min)	λ _{max} (nm) ^b	% III/II	% A _B /II	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)
1	não identificado	6,3	337, 408, 429, 449	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	all- <i>trans</i> -luteína	13,6	419, 444, 472	61	0	569	551[M+H-18], 533[M+H-18-18], 477[M+H-92], 459[M+H-18-92]
3	all- <i>trans</i> -zeaxantina	16,3	420, 450, 475	20	0	569	551[M+H-18], 533[M+H-18-18], 463[M+H-106]
4a	5,6-epoxi-β-criptoxantina	17,6	420, 445, 473	54	0	569	551[M+H-18], 533[M+H-18-18], 221
4b	fiteno	17,6	276, 286, 300	0	0	545	489, 435, 395, 339[M-205]
5	13- ou 13'- <i>cis</i> -β-criptoxantina	20,3	339, 412, 443, 469	15	45	553	535[M+H-18], 495[M+H-56], 461[M+H-92]
6	all- <i>trans</i> -β-criptoxantina	24,3	420, 451, 477	25	0	553	535[M+H-18], 495[M+H-56], 461[M+H-92]
7	13- <i>cis</i> -β-caroteno	27,1	339, 420, 443, 471	14	44	537	444[M-92]
8	all- <i>trans</i> -α-caroteno	29,2	420, 445, 473	60	0	537	481[M+H-56], 444[M-92]
9	all- <i>trans</i> -β-caroteno	34,0	425, 451, 478	25	0	537	444[M-92]
10	9- <i>cis</i> -β-caroteno	36,5	338, 420, 447, 472	20	19	537	444[M-92]

n.d., não detectado

^a Numerado de acordo com o cromatograma mostrado na Figura 2.^b Gradiente linear metanol/éter metil *tert*-butílico.

TABELA 3 - Teores de compostos bioativos encontrados em amora-preta.

compostos bioativos	concentração ^d
compostos fenólicos totais ^b	241,7 ± 0,8 mg GAE/100 g
flavonoides totais ^c	173,7 ± 0,7 mg CE/100 g
antocianinas totais	90,5 ± 0,1 mg/100g
antocianinas monoméricas ^d	104,1 ± 1,8 mg/100 g
carotenoides totais	86,5 ± 0,2 µg/100 g

^a Média e desvio-padrão de análises em duplicata.^b valores expressos em equivalente de ácido gálico.^c valores expressos em equivalente de catequina.^d calculado como cianidina 3-glucosídeo.

TABELA 4 - Atividade antirradical livre de diferentes extratos de amora-preta.

<i>extratos</i>	atividade antirradical livre ^a
metanol 80%	2209,7± 68,4 mM TEAC/100 g 33,8 ± 1,8 mg amostra/mg DPPH
1% HCl em metanol	1423,5 ± 15,3 mM TEAC/100 g
etanol/HCl 85:15	1455,1 ± 1,2 mM TEAC/100 g
metanol pH 3,6	946,5 ± 4,6 mM TEAC/100 g

^a Média e desvio-padrão de análises em duplicata.

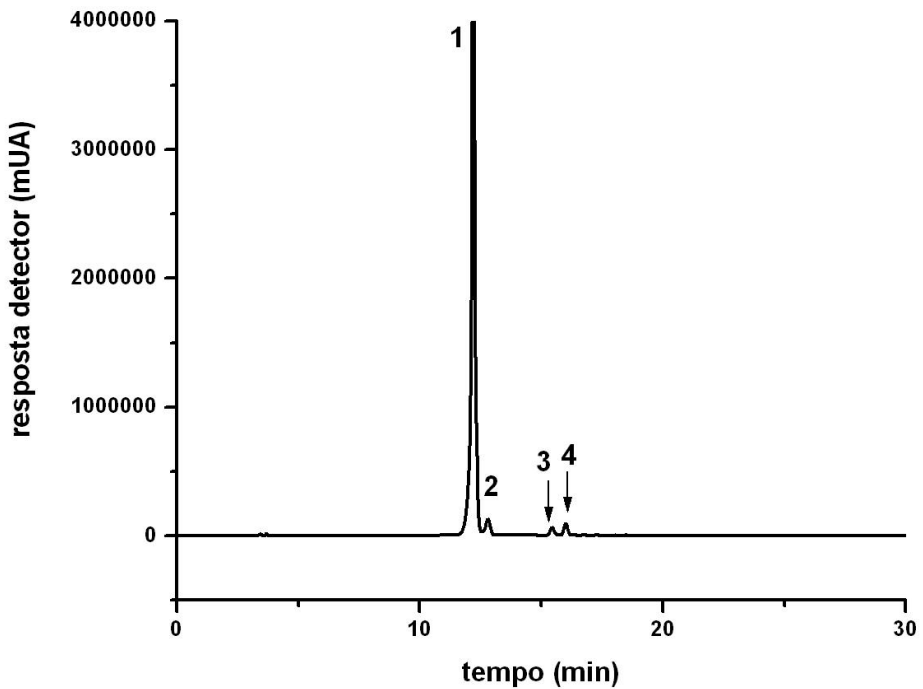


FIGURA 1 - Cromatograma (processado a 520 nm) do extrato antocianico de amora-preta, obtido por HPLC-PDA-MS/MS. A identificação dos picos está apresentada na Tabela 1.

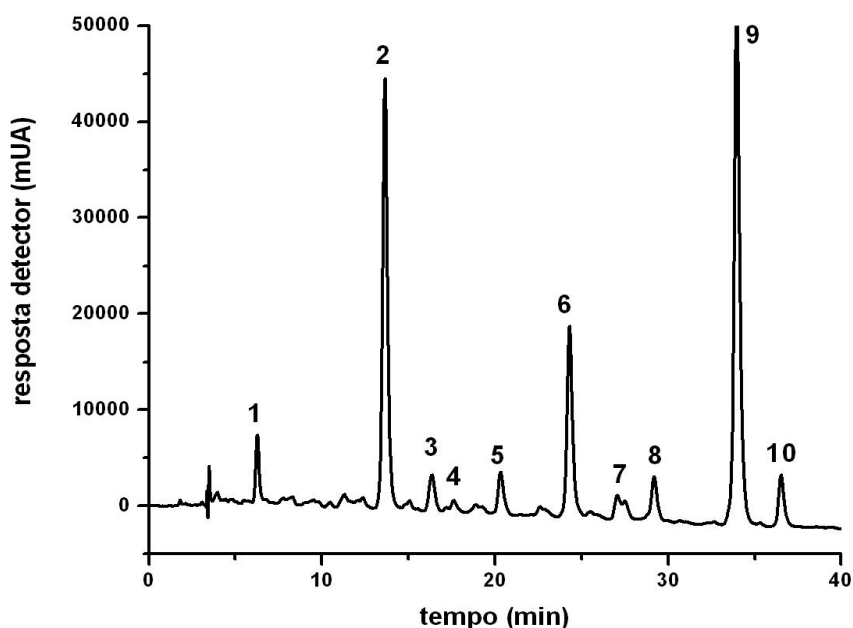


FIGURA 2 - Cromatograma (processado a 450 nm) de carotenoides de amora-preta, obtido por HPLC-PDA-MS/MS. A identificação dos picos está apresentada na Tabela 2.

CONCLUSÃO

Como esperado, as amoras-pretas, conhecidas como *berries*, produzidas no Brasil, possuem baixo teor de carotenoides e alto teor de antocianinas. Além disso, estas frutas apresentam elevado potencial antioxidante, principalmente pelos teores representativos de compostos fenólicos totais e flavonoides, com destaque para o alto conteúdo da antocianina cianidina 3-glucosídeo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, L.E.C.; DUARTE FILHO, J.; SOUZA, C.M. de. Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.3, p.413-419, 2003.

ANTUNES, L.E.C.; TREVISAN, R.; GONÇALVES, E.D.; FRANZON, R.C. Produção Extemporânea de Amora-preta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.3, p.430-434, 2006.

BARRETO, G.P.M.; BENASSI, M.T.; MERCADANTE, A.Z. Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. **Journal Brazilian Chemical Society**, São Paulo, 2009. In press

BENVENUTI, S.; PELLATI, F.; MELEGARI, M.; BERTELLI, D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.69, n.3, p.164-169, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Zurich, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRITTON, G. UV/visible Spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H (Ed.). **Carotenoids: spectroscopy**. Basel: Birkhauser, 1995. v. 1B, p. 13-62.

DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n.22, p. 9135-3141, 2007a.

- DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.55, n.13, p.5062-5072, 2007b.
- DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives Biochemistry Biophysics**, Amsterdam, v.274, n.2, p.532-538, 1989.
- FAN-CHIANG, H.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanin pigment composition of blackberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v.70, n.3, p.198-202, 2005.
- FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. London: Academic Press, 1982. p.181-206.
- GUTIÉRREZ, I.H. Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a cencibel young red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, n.14, p.4079-4083, 2003.
- HAGER, T.; HOWARD, L.R.; PRIOR, R.L. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.56, n.3, p.689-695, 2008.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; MOTA, R.V.; CORDEUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.3, p.702-708, 2008.
- HEINONEN, M.I.; OLLILAINEN, V.; LINKOLA, E.K.; VARO, P.T.; KOIVISTOINEN, P.E. Carotenoids in finnish foods: vegetables, fruits, and berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.37, n.3, p.655-659, 1989.
- JEPSON R.G.; CRAIG J.C. **The American heritage science dictionary**. North America: Houghton Mifflin Company, 2005. p. 704.
- JURD, L.; ASEN, S. The formation of metal and "copigment" complexes of cyanidin 3-glucoside. **Phytochemistry**, Oxford, v.5, n.6, p.1263-1271, 1966.
- KIM, D.O.; JEONG, S.W.; LEE, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, Oxford, v.81, n.3, p.321-326, 2003.
- LEE, J.; DURST, R.W.; WROLSTAD, R.E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, Maryland, v.88, n.5, p.1269-1278, 2005.
- LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. p.627.
- MARINOVA, D.; RIBAROVA, F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. **Journal of Food Composition and Analysis**, Roma, v.20, n.5, p.370-374, 2007.
- MAZZA, G.; FUKUMOTO, L.; DELAQUIS, P.; GIRARD, B.; EWERT, B. Anthocyanins, phenolics, and color of *Cabernet Franc*, *Merlot*, and *Pinot Noir* wines from British Columbia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.47, n.10, p.4009-4017, 1999.
- METIVIER, R.P.; FRANCIS, F.J.; CLYDESDALE, F.M. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. **Journal of Food Science**, Chicago, v.45, n.4, p.1099-1100, 1980.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology Medicine**, Amsterdam, v.26, n.9-10, p.1231-1237, 1999.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology Medicine**, Amsterdam, v.20, n.7, p.933-956, 1996.
- SATUÉ-GRACIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, n.9, 3362-3367, 1997.
- SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phe-

- nolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n.8, p. 2432-2438, 2002.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A.Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.16, n.3, p.144-158, 1965.
- WANG, S.Y.; BOWMAN, L.; DING, M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. **Food Chemistry**, Oxford, v.107, n.3, p.1261-1269, 2008.
- 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 Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, n.2, p.140-146, 2000.
- WU, X.; PRIOR, R. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, n.7, p.2589-2599, 2005.
- ZANATTA, C.F.; CUEVAS, E.; BOBBIO, F.O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A.Z. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS and NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, n.24, p.9531-9535, 2005.
- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, Oxford, v.64, n.4, p.555-559, 1999.