

Avaliação da influência do tempo de congelamento no potencial antioxidante e teor de cianidina-3-glicosídeo em frutos de amora-preta**Evaluation of freezing storage in the antioxidant capacity and content of cyanidin-3-glucoside in blackberry fruits**

DOI:10.34117/bjdv6n3-401

Recebimento dos originais: 10/02/2020

Aceitação para publicação: 25/03/2020

Josué Guilherme Lisbôa Moura

Faculdade de Farmácia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos.
Avenida Unisinos, nº 950, CEP 93022-750, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil.
josuemoura@hotmail.com.br

Patricia Soeiro Petroski

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade do Vale do Rio dos Sinos.
Avenida Unisinos, nº 950, CEP 93022-750, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil.
patipetroski@gmail.com

Deise Lucas de Lima

Faculdade de Nutrição, Universidade do Vale do Rio dos Sinos.
Avenida Unisinos, nº 950, CEP 93022-750, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil.
deise.lucass@hotmail.com

Vanessa Mossmann

Faculdade de Farmácia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos.
Avenida Unisinos, nº 950, CEP 93022-750, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil.
vanemossmann@hotmail.com

Patrícia Weimer

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Av. Ipiranga, nº 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
patriciaweimer8@gmail.com

Juliana de Castilhos

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade do Vale do Rio dos Sinos.
Avenida Unisinos, nº 950, CEP 93022-750, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil.
jdecastilhos@unisinos.br

Valmor Ziegler

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade do Vale do Rio dos Sinos.
Avenida Unisinos, nº 950, CEP 93022-750, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil.
valmorziegler12@unisinos.br

Rochele Cassanta Rossi

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade do Vale do Rio dos Sinos.
Avenida Unisinos, nº 950, CEP 93022-750, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil.
rochelecr@unisinos.br

RESUMO

A amora-preta ganha destaque pela alta concentração de antocianidinas, que estão relacionadas com as suas propriedades antioxidantes. Porém, essa baga têm uma estrutura frágil e alta atividade respiratória, o que torna sua vida pós-colheita muito curta, sendo encontrada para consumo in natura apenas em um período curto no ano. Este estudo objetivou avaliar a influência do tempo de congelamento no teor dos compostos bioativos dos frutos de amora-preta. Para tal, comparou-se o teor de compostos fenólicos, o potencial antioxidante in vitro e o teor de cianidina-3-glicosídeo do suco de amora-preta in natura e após 5, 10, 15, 20 e 30 dias de congelamento a -20 °C. Para a avaliação do teor de compostos fenólicos totais utilizou-se a técnica de Folin Ciocalteau, a capacidade antioxidante foi determinada pelo método de captura de radical ABTS e a quantificação de cianidina-3-glicosídeo foi realizada utilizando CLAE-UV. O teor de compostos fenólicos no suco in natura da amora e da fruta congelada caiu de $839,9 \pm 4,3 \mu\text{g EAG/mL}$ no tempo zero, para $706,2 \pm 2,8 \mu\text{g EAG/mL}$ no 15º dia. A capacidade antioxidante foi de $7911,946 \pm 0,932 \mu\text{mol ET/mL}$ para o suco in natura, com redução de $85,37 \pm 1,38\%$ após 30 dias de congelamento. Na quantificação de cianidina-3-glicosídeo o teor inicial obtido foi de $228,0 \pm 1,54 \mu\text{g/mL}$ para o suco da amora in natura com perda $< 6\%$ durante os 30 dias de congelamento. Portanto, o suco de amora-preta in natura possui maior teor de compostos fenólicos e antioxidantes do que a amora-preta congelada.

Palavras-chave: Amora-preta; Congelamento; Antioxidante; Compostos Fenólicos; Cianidina-3-glicosídeo.

ABSTRACT

Blackberry stands out for its high concentration of anthocyanidins, which are related to its antioxidant properties. However, this berry has a fragile structure and high respiratory activity, which small shelf-life, being found for fresh consumption only in a short period of the year. The intention of this study to evaluate the influence of freezing time on the content of bioactive compounds in blackberry fruits. For this purpose, the content of phenolic compounds, the antioxidant potential in vitro and the cyanidin-3-glycoside content of fresh blackberry juice were compared and after 5, 10, 15, 20 and 30 days of freezing at -20 °C. The Folin Ciocalteau technique was used to evaluate the total phenolic content, the antioxidant capacity was determined by the ABTS radical scavenging assay and the quantification of cyanidin-3-glucoside was performed using HPLC-UV. The content of phenolic compounds in the fresh juice of blackberry and frozen fruit decreased of $839.9 \pm 4.3 \mu\text{g GAE/mL}$, at time zero, to $706.2 \pm 2.8 \mu\text{g GAE/mL}$ on day 15. The antioxidant capacity was $7911.946 \pm 0.932 \mu\text{mol TE/mL}$ for fresh juice, with a reduction of $85.37 \pm 1.38\%$ after 30 days of freezing. In the quantification of cyanidin-3-glucoside the initial content obtained was $228.0 \pm 1.54 \mu\text{g/mL}$ for fresh blackberry juice with loss $< 6\%$ during the study period. Therefore, fresh blackberry juice has a higher content of phenolic compounds and antioxidants than frozen blackberry.

Keywords: Blackberry; Freezing; Antioxidant; Phenolic compounds; Cyanidin-3-glucoside.

1 INTRODUÇÃO

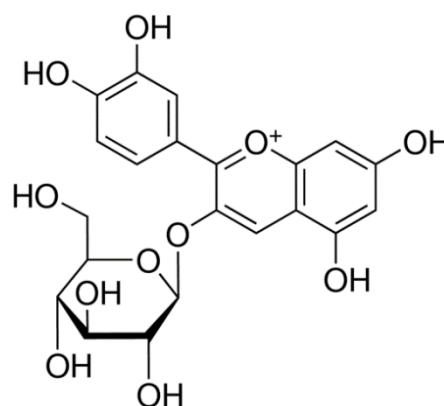
Os chamados frutos vermelhos, ou bagas, destacam-se por suas propriedades antioxidantes, que estão relacionadas à alta concentração de polifenóis (HIDALGO; ALMAJANO, 2017). Os polifenóis são compostos orgânicos encontrados em abundância nos vegetais e tornaram-se um alvo nas pesquisas na área da nutrição nas últimas décadas, onde um número expressivo de resultados vem indicando que o consumo de polifenóis pode desempenhar um papel vital na saúde através da

regulação do metabolismo, peso, doenças crônicas e proliferação celular (LECOUR; LAMONT, 2011; CORY et al., 2018; LAVEFVE; HOWARD; CARBONERO, 2020).

A amora-preta (*Rubus* sp.) está entre as espécies de bagas com alta produção e cultivo em todo o mundo, devido ao baixo custo de produção, facilidade de manejo, rusticidade e necessidade de utilização de poucos defensivos agrícolas, quando comparada à outras culturas. Além disso, essa demanda é atribuída à diferentes variáveis, de econômicas a sociais, mas também às suas características fitoquímicas, que podem ter atividade nutracêutica (ANTUNES et al., 2014).

Amoras são fontes ricas em antocianina, um polifenol, sendo o conteúdo total de antocianina da amora-preta superior ao de outras frutas (HALVORSEN et al., 2006; VIZZOTTO et al., 2012; WEN et al., 2016). Principalmente pelos teores representativos de compostos fenólicos totais, estas frutas apresentam elevado potencial antioxidante (CELANT et al., 2016; CROGE et al., 2019) com destaque para o alto conteúdo da antocianina cianidina-3-glicosídeo (WU; PRIOR, 2005; FERREIRA; ROSSO; MERCADANTE, 2010). A Figura 1 apresenta a estrutura molecular do composto cianidina-3-glicosídeo, de massa molecular 449,4 g/mol.

Figura 1 – Estrutura molecular da cianidina-3-glicosídeo



Um estudo *in vitro* com células JB6 (células da epiderme de ratos), pré-tratadas com cianidina-3-glicosídeo isolada da amora-preta, observou inibição da ativação e expressão das enzimas quinases e fatores envolvidos no processo de formação do câncer de pele induzido pela ação de raios UV-B. O mesmo composto também inibiu a proliferação celular *in vitro* da linhagem A549 de câncer de pulmão. Além disso, resultados demonstram que esse composto inibe a carcinogênese e a metástase de tumor *in vivo* (DING et al., 2006). Outros resultados mostram eficácia da cianidina-3-glicosídeo na neutralização da secreção de óxido nítrico e prostaglandina E2 induzida por lipopolissacarídeos, inibindo a expressão de óxido nítrico sintase e ciclooxigenase-2, marcadores associados a processos inflamatórios diversos (PEREIRA; ALMEIDA; DINIS, 2018). Portanto, a cianidina 3-glicosídeo

apresenta potencial aplicação devido às suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (CHEN et al., 2005; SERRA; ALMEIDA; DINIS, 2016; KE et al., 2019; LIANG et al., 2019).

O curto período de colheita e a ligeira perda da qualidade pós-colheita, caracterizam uma grande limitação quanto ao fornecimento dos frutos *in natura* ao consumidor. Uma alternativa para o aproveitamento econômico desses frutos é a industrialização, na forma de polpa para utilização em produtos lácteos (como matéria prima ou aditivo de cor e sabor), ou na forma de sucos e geleias, sendo que essas possibilidades se dão a partir do congelamento das bagas (ANTUNES; DUARTE FILHO; SOUZA, 2003; MOTA, 2006; ANTUNES et al., 2014). Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar se o processo de congelamento dos frutos de amora-preta influencia no perfil antioxidante *in vitro* e no teor de cianidina-3-glicosídeo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 REAGENTES

As substâncias padrão Trolox (ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), cianidina-3-glicosídeo e os reagentes ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal diamônio), persulfato de sódio, Folin-Ciocalteu foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. A água ultrapurificada foi obtida pelo sistema Milli-Q[®] (Millipore, Billerica, USA). Para a quantificação de cianidina-3-glicosídeo foram empregados reagentes e solventes, acetonitrila e ácido fosfórico, com grau de pureza apropriado para cromatografia líquida de alta eficiência e adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

2.2 MATERIAL VEGETAL

Os frutos de amora-preta (*Rubus* sp.), da cultivar Tupy em estágio maduro e íntegros, foram coletados no município de Feliz (Rio Grande do Sul, Brasil), em outubro de 2017. Após a coleta, todos os frutos foram higienizados com água e separados nos grupos de análise, sendo eles, frutos *in natura* (tempo zero) e frutos submetidos a congelamento a -18 °C, por 5, 10, 15, 20 e 30 dias.

2.3 PREPARO DA AMOSTRA

Os frutos de amora preta foram processados nos tempos previamente estabelecidos (0, 5, 10, 15, 20 e 30 dias de congelamento), na forma de suco. Para tal, utilizou-se a proporção 1:1 de massa de fruta e volume de água ultra-pura e realizou-se a extração com auxílio de mixer (Walita, 400 watts). Após a extração, as amostras de sucos foram centrifugadas a 5000 rpm, -4 °C por 10 min. Os sobrenadantes foram submetidos a filtração simples para remoção de material particulado que

pudesse interferir nas análises espectrofotométricas e a filtração com membrana de PVDF (0,45 μm) para análises cromatográficas.

2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos totais (CFT) foram mensurados em termos de equivalentes de ácido gálico (EAG), por método espectrofotométrico com reagente de Folin-Ciocalteu (MEDA et al., 2005; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). A quantificação por esta técnica se fundamenta na capacidade de redução dos sais de molibdênio (Mo^{6+}) e tungstênio (W^{6+}) pelos compostos fenólicos presentes nas amostras. Desta forma, para a determinação de CFT elaborou-se uma curva padrão de ácido gálico (0,05 a 1,00 mg/mL) em água ultra-pura e com adição de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N. Após incubação das soluções por 2 h, ao abrigo da luz, as absorvâncias foram mensuradas a (λ) 760 nm.

As amostras de sucos foram submetidas aos mesmos procedimentos da curva-padrão e foram analisadas em triplicata. Os resultados finais foram expressos em μg EAG/mL suco.

2.5 DETERMINAÇÃO DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A determinação da atividade antioxidante *in vitro* foi realizada pela técnica de redução do cátion ABTS^{++} em meio alcoólico, segundo metodologia descrita por Re et al. (1999), com algumas modificações. As amostras de sucos foram incubadas com solução alcoólica do radical ABTS^{++} , por 30 minutos ao abrigo da luz. Transcorrido o período da incubação, as absorvâncias foram determinadas a 734 nm em espectrofotômetro (UV-2600, Shimadzu, Japão). Como substância antioxidante padrão utilizou-se Trolox e uma curva-padrão foi preparada sob as mesmas condições descritas para as amostras. Os resultados finais foram expressos em μmol ET/L de suco.

2.6 QUANTIFICAÇÃO DE CIANIDINA 3-GLICOSÍDEO

As análises cromatográficas foram realizadas segundo método descrito por Zanatta e colaboradores (2005) em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE, Shimadzu, Japão). Para a separação cromatográfica, utilizou-se coluna Zorbax SB-18 (C_{18} 250 x 4,6 mm e 5 μm) acoplada à pré-coluna Zorbax SB-18 4-POCK (Agilent Technologies) e fase móvel composta de acetonitrila (A) e água ultra-pura acidificada com 4% v/v de ácido fosfórico (B), com eluição em modo gradiente, na proporção de 85:15 a 15:85 (A:B) em 30 min. O volume de injeção foi de 20 μL , vazão de 1 mL/min, temperatura de forno de 25 °C. A detecção de cianidina-3-glicosídeo foi realizada a (λ) 520 nm.

Para a quantificação elaborou-se uma curva-padrão de cianidina-3-glicosídeo na faixa de concentração de 5,00 a 20,00 $\mu\text{g/mL}$. Tanto as amostras de suco de amora, quanto as soluções padrões de cianidina-3-glicosídeo foram preparadas em fase móvel e previamente filtradas com membranas de PVDF de diâmetro de poro de 0,45 μm . Os resultados foram expressos em μg cianidina 3-glicosídeo/mL suco.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média±desvio-padrão. Os dados foram avaliados no *software GraphPad Prism 6* e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) com teste *post hoc* de Tukey, com nível significância estabelecido em 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O teor de compostos fenólicos das amostras do suco *in natura* e congelado da amora-preta (*Rubus* sp.), foi calculado através da curva padrão de ácido gálico, sendo os resultados estão apresentados na Tabela 1. No presente estudo a média de valor de compostos fenólicos para o suco *in natura* foi de $839,9 \pm 4,3$ µg EAG/mL suco, enquanto que o suco da fruta congelada foi de $706,2 \pm 2,8$ µg EAG/mL suco.

Tabela 1 – Resultado quantificação de compostos fenólicos totais

Tempo de congelamento (dias)	µg EAG/mL suco
0	$839,9 \pm 4,3$
15	$706,2 \pm 2,8$

EAG: equivalentes de ácido gálico

Esse dado está na contramão dos resultados de Jacques et al. (2010), que também analisaram o congelamento do cultivar de amora-preta Tupy, armazenado em diferentes condições de temperatura. Nesse estudo, os autores concluem que o armazenamento a -10 °C não foi suficiente para causar alterações significativas no teor total de fenólicos, da mesma forma, a -18 °C, onde não só o teor total de fenólicos, mas também, a capacidade antioxidante foi mantida por quatro meses.

No estudo de Araújo et al. (2009) de um néctar com o cultivar Tupy, os teores de compostos fenólicos totais decresceram nos primeiros 30 dias de armazenamento, com posterior elevação a partir do 45º dia de ensaio, assim como Leitão (2007) que verificou o acréscimo de aproximadamente 18% em néctar de amora-preta armazenado sob refrigeração, comportamento que pode ser decorrente de reações de copigmentação ocorridas durante o armazenamento (SELLAPPAN; AKOH; KREWER, 2002).

Similarmente, Haida et al. (2015) observaram que goiabas congeladas, por até 60 dias, possuem maiores teores de compostos fenólicos em relação às frescas, mas os autores não revelam qual a temperatura de congelamento e as condições de congelamento, sendo que recentemente Gonçalves, Portari e Jordão (2019) relataram que o congelamento de goiaba, em -20 °C por 8

semanas, reduz em aproximadamente 30% dos fenólicos totais. O aumento no teor de compostos fenólicos presentes nesses frutos, possivelmente ocorre, pois, durante o congelamento há o rompimento das estruturas celulares, sendo esse fenômeno já observado em peras e, inclusive, em bagas como morangos (HÄKKINEN et al., 2000). Mesmo assim, Gonçalves, Portari e Jordão (2019) apresentaram uma diminuição em 60,2% dos fenólicos totais em peras congeladas a -20 °C.

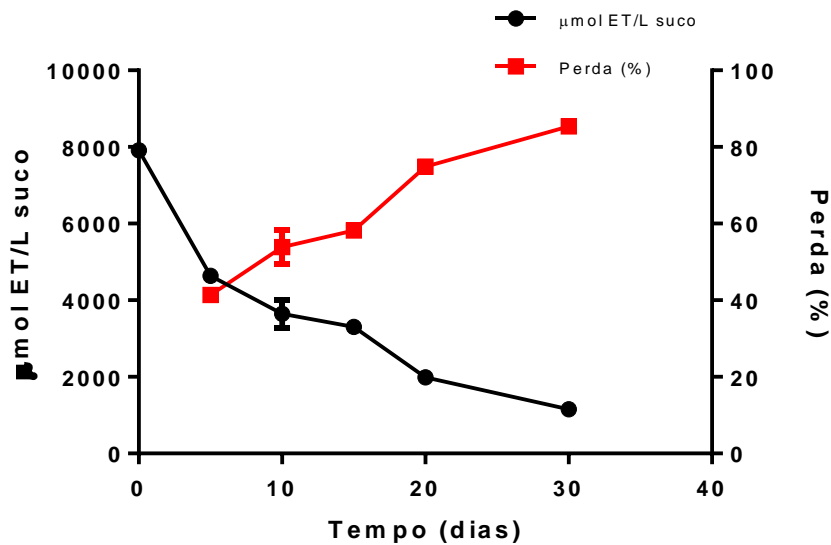
Machado, Monteiro e Tiecher (2019) avaliaram a influência do congelamento (-18 °C) sobre os compostos fenólicos totais de polpas de *Physalis peruviana* L., pasteurizada e não-pasteurizada. Reportaram que o teor de compostos fenólicos sofre redução significativa ($p \leq 0,05$) ao longo do armazenamento e, após 120 dias demonstraram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos, indicando que a pasteurização promoveu a perda de compostos fenólicos.

Outro estudo investigou o efeito da liofilização e secagem por *spray-drying* sobre compostos fenólicos da polpa de mamão. A polpa congelada foi liofilizada a -62 °C durante 48 h. Os produtos secos por *spray-drying* apresentaram maior retenção de compostos fenólicos em comparação com os produtos liofilizados (GOMES et al., 2018). Um efeito semelhante foi observado por Horszwald, Julien e Andlauer (2013), que encontraram um maior teor de polifenóis totais na arônia após a secagem a altas temperaturas, do que após a liofilização. Essas pesquisas devem ser devidamente interpretadas, visto que a operação de congelamento pode também ser um processo inerente a industrialização, não apenas como método de conservação, e afetar a quantidade do teor dos fenólicos totais.

Portanto, expor frutas ao congelamento pode diminuir o conteúdo e a biodisponibilidade dos compostos fenólicos, uma vez que são componentes suscetíveis a processos altamente instáveis (SARTORI; COSTA; RIBEIRO, 2014). Por outro lado, processamento em altas temperaturas desativam as enzimas oxidativas e hidrolíticas, resultando consequentemente em evitar perdas de componentes polifenólicos. Além disso, é sabido que o processamento térmico a altas temperaturas pode liberar mais ácidos fenólicos ligados da quebra de constituintes celulares, podendo levar à presença de compostos fenólicos que não foram detectados em amostras de polpa fresca (DEWANTO et al., 2002).

3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A influência do tempo de congelamento na capacidade antioxidante *in vitro* dos frutos de amora-preta processados na forma de suco podem ser visualizados na Figura 2, em termos de $\mu\text{mol ET/L}$ de suco e percentual de perda da atividade antioxidante.

Figura 2 – Resultados da atividade antioxidante *in vitro* de frutos de amora-preta submetidos a congelamento

ET: equivalentes de Trolox; *Perda (%): percentuais de perda calculados com referência ao tempo zero (fruta *in natura*).

No quinto dia de congelamento é observado uma queda de $41,34 \pm 0,95\%$ na atividade antioxidante *in vitro*, quando comparado ao tempo zero, onde a análise de ABTS demonstrou ser de $7911,95 \pm 189,93 \mu\text{mol ET/L}$. Nos 10^o, 15^o e 20^o dias as perdas em relação ao tempo zero foram de $53,90 \pm 4,51\%$, $58,19 \pm 1,93\%$ e $74,88 \pm 0,73\%$, respectivamente. Em 30 dias a queda na capacidade antioxidante *in vitro* era de $85,37 \pm 1,38\%$, em relação ao tempo zero. Não houve diferença estatística somente entre os tempos 10 e 15 dias ($p > 0,05$), nos demais tempos observou-se uma queda expressiva na capacidade antioxidante.

A correlação entre compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante nas amoras-pretas é fraca, pois em bagas pode haver outros fitoquímicos e/ou vitaminas que podem influenciar o poder antioxidante. Variação nos teores antioxidantes em amora-preta é comumente observada (VIZZOTTO et al., 2012).

Mesmo com um elevado conteúdo de ácido ascórbico, há apenas uma pequena contribuição deste ácido com a atividade antioxidante, pois existem outros compostos, incluindo os fenólicos, que contribuem mais efetivamente na atividade antioxidante apresentada por frutas (ROJAS-BARQUERA; NARVÁEZ-CUENCA, 2009). Atualmente se aceita a prerrogativa que a amora-preta contém maiores quantidades de antocianinas e, a essa classe de polifenóis, que atribuem os efeitos antioxidantes *in vitro* e *in vivo* (ZHANG et al., 2012; WEN et al., 2015; GOWD; BAO; CHEN, 2019), até mesmo por as antocianinas presentes em bagas possuem estruturas químicas maiores, com mais hidroxilas e portanto maior capacidade de capturar radicais livres, por isso, a essa classe que se atribui o poder antioxidante.

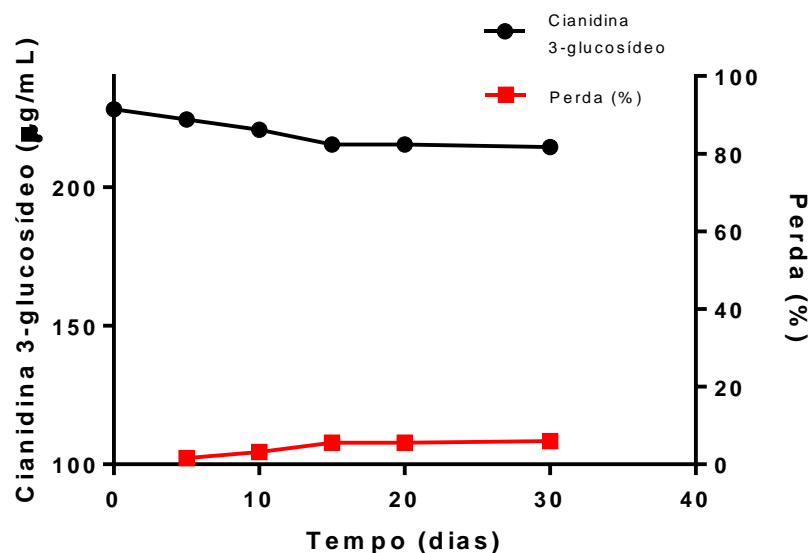
Assim como os resultados desse trabalho, Haida et al. (2014) apontaram que a atividade antioxidante da amora-preta foi ótima em frutos frescos nas concentrações de 80 a 40 mg/mL, a partir de 30 dias de congelamento já ocorreu perda da propriedade antioxidante. Bem como para Araújo et al. (2009), onde a atividade antioxidante do néctar da amora-preta diferiu estatisticamente em praticamente todos os intervalos de tempo estudados, exceto aos 30 e 90 dias, nesse estudo o potencial antioxidante decresceu até o 45º dia de armazenamento, aumentou ao 60º dia e voltou a diminuir.

Parâmetros como antocianinas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante são aqueles que apresentam maior variação entre as frutas *in natura* submetidas ao congelamento (SANTOS et al., 2019). No estudo de Gonçalves, Portari e Jordão (2019), a pera foi a fruta mais afetada pelo processo de congelamento, com perda de 96,2% de antocianinas, enquanto a goiaba foi a fruta que se mostrou mais resistente ao congelamento, apresentando 32,4% menos antocianinas no fim de 60 dias, demonstrando que o congelamento implica na atividade antioxidante.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DE CIANIDINA-3-GLICOSÍDEO

Os resultados da quantificação cromatográfica de cianidina-3-glicosídeo são apresentados na Figura 3, expressos em $\mu\text{g/mL}$ de suco e em termos de perda percentual, por tempo de congelamento.

Figura 3 – Resultados da quantificação de cianidina 3-glicosídeo frutos de amora-preta submetidos a congelamento



*Perda (%): percentuais de perda calculados com referência ao tempo zero (fruta *in natura*)

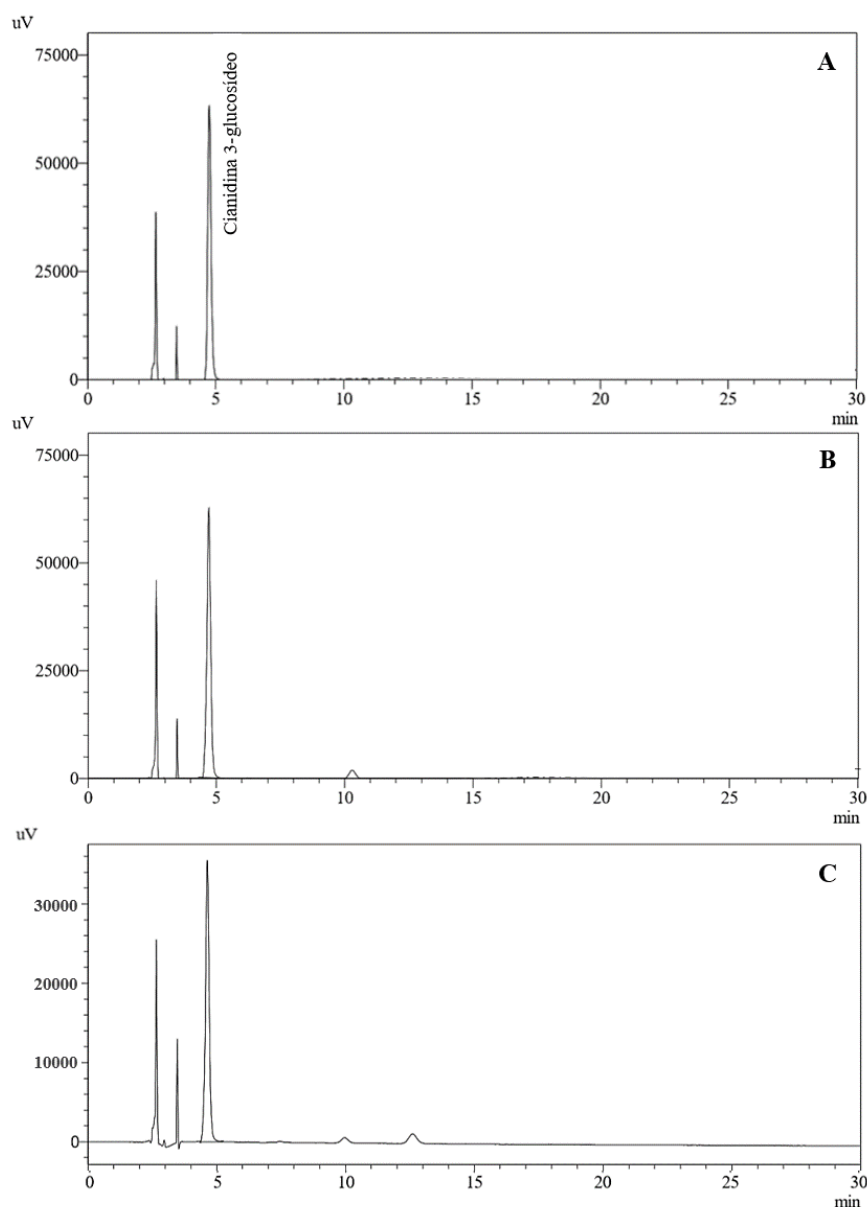
No tempo zero a concentração de cianidina-3-glicosídeo era de $228,0 \pm 1,54 \mu\text{g/mL}$ e, em 30 dias a concentração era de $214,4 \pm 0,44 \mu\text{g/mL}$, uma queda de $5,96 \pm 0,19\%$ desde o início do experimento. No 5º dia foi registrado queda de $1,59 \pm 0,24\%$. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os últimos três tempos avaliados (15, 20 e 30 dias), onde as perdas foram de $5,55 \pm$

0,16%, $5,58 \pm 0,24\%$ e $5,96 \pm 0,19\%$, respectivamente, indicando que o teor de cianidina-3-glicosídeo decaiu na etapa inicial de congelamento. Por outro lado, o mesmo comportamento não foi evidenciado na atividade antioxidante (Fig. 2), em que há um decaimento entre os tempos 15, 20 e 30 dias, indicando que esta atividade está relacionada com a presença de outros compostos fenólicos, além da cianidina-3-glicosídeo. Portanto, sugere-se que estes compostos sofreram degradação durante o congelamento.

Ao analisar os dados de teor de compostos fenólicos totais e quantificação de cianidina-3-glicosídeo em conjunto, pode-se verificar uma diferença de 612,0 e 491,2 $\mu\text{g/mL}$ suco, nos tempos 0 e 15 dias, respectivamente. Estas diferenças correspondem a quantidade de compostos fenólicos presentes que não correspondem à molécula ativa pesquisada. Ou seja, entre os tempos 0 e 15 dias houve uma perda de aproximadamente 5,5% do teor de cianidina-3-glicosídeo e 19,7% dos demais compostos fenólicos.

Na Figura 4 é possível observar os cromatogramas representativos do padrão de cianidina-3-glicosídeo (Fig. 4A), amostra do suco dos frutos *in natura* (Fig. 4B) e amostra do suco dos frutos após 15 dias de congelamento (Fig. 4C). Nos três cromatogramas há sobreposição do pico referente a cianidina-3-glicosídeo, com tempo de retenção de 4,70 min. A amostra de amora *in natura* apresentou a mesma intensidade de pico do composto ativo observado no padrão, sendo que após 15 dias de congelamento ocorreu uma redução na intensidade, estando de acordo com o decaimento do teor de cianidina-3-glicosídeo (Fig. 3).

Figura 4 – Cromatogramas da quantificação de cianidina-3-glicosídeo obtidos por CLAE-DAD



(A) Cromatograma representativo do padrão de cianidina-3-glicosídeo (10 $\mu\text{g/mL}$); (B) Cromatograma representativo amostra de frutos de amora-preta *in natura* (tempo 0); (C) Cromatograma representativo amostra de frutos de amora-preta congelados (tempo 15 dias). *Comprimento de onda: 520 nm.

Um estudo avaliou a atividade antioxidante de pigmentos antocianicos, onde a cianidina-3-glicosídeo apresentou atividade duas vezes superior ao Trolox, indicando que este composto possui potente propriedade antioxidante (KUSKOSKI et al., 2004). Dessa forma, a atividade antioxidante no fim dos 30 dias de congelamento pode-se atribuir majoritariamente a cianidina-3-glicosídeo, visto que houve uma perda de menos de 6% nesse período. O desafio agora consiste em descobrir se a faixa de 220 $\mu\text{g/mL}$ traz benefícios concretos para a saúde humana.

Após o consumo de antocianinas, entre os compostos glicosilados, as cianidinas di- e tri-glicosídeos apresentam uma maior concentração no trato gastrointestinal do que a cianidina-3-

glicosídeo, pois ocorre a complexação das antocianinas. As antocianinas que apresentam um maior número de conjugações são mais estáveis e assim mais resistentes à microbiota intestinal não sendo degradadas, sendo facilmente encontrada na sua forma íntata no trato gastrointestinal (WU; PITTMAN; PRIOR, 2005). Em contrapartida as antocianidinas glicosídeas são hidrolisadas pela microbiota intestinal, sendo que a antocianina que apresenta uma maior absorção ao longo do trato gastrointestinal é a cianidina-3-glicosídeo (TIAN et al., 2006).

Da presença de cianidina-3-glicosídeo no intestino, sabe-se que resultam vários metabolitos, sendo o ácido protocatecuico com maiores taxas de concentração no trato gastrointestinal (VITAGLIONE et al., 2007), podendo ser este o principal causador dos efeitos anti-inflamatórios observados, resultantes do consumo de antocianinas. A metabolização de cianidina-3-glicosídeo no trato gastrointestinal forma novos radicais capazes de captar radicais livres devido à quebra da estrutura (TSUDA et al. 1996; TSUDA; HORIO; OSAWA, 1999).

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que, o suco de amora-preta (*Rubus* sp.) *in natura* obteve maior resultado em relação à quantificação de polifenóis e conteúdo do marcador, cianidina-3-glicosídeo, apresentando maior atividade antioxidante quando comparado ao suco da fruta congelada, independente do período, diferindo estatisticamente. Neste trabalho, a diminuição da atividade antioxidante está diretamente associada aos decréscimos de compostos fenólicos e antocianinas, indicando que essas substâncias são as possíveis responsáveis pelo potencial antioxidante.

A temperatura de congelamento é um fator determinante e que poderá ter total influência nos resultados ou, por lesar as membranas celulares ou, por não inibir a atividade celular do vegetal. Neste estudo, avaliou-se as alterações nos parâmetros mensurados sob armazenamento a temperatura constante de -20 °C. Estudos sugerem que temperaturas inferiores, como -80 °C, sejam mais eficientes para manter a estabilidade dos principais compostos fitoquímicos presentes na amora-preta por períodos prolongados. Contudo, também é possível evidenciar a degradação parcial destes compostos. Ademais, equipamentos específicos para congelamento a -80 °C são relativamente mais dispendiosos, em termos de custo agregado para aquisição e utilização. Além disso, considerando que a produção dos frutos de amora-preta é majoritariamente composta por pequenos produtores, a utilização destes equipamentos não é compatível com as características do setor produtivo.

Por fim, embora os resultados tenham diferença estatística e significância estatística, as perspectivas consistem na avaliação da significância clínica dessa diferença estatística. Portanto, estudos complementares *in vivo* e estudos observacionais são necessários a fim de verificar a relação

entre efeitos benéficos e quantidades de compostos bioativos presentes nos frutos congelados de amora-preta.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, Luís Eduardo Corrêa et al. Produção de amoreira-preta no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.100-111, mar. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-450/13>.

ARAÚJO, Paula Ferreira de et al. INFLUÊNCIA DO CONGELAMENTO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E O POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE NÉCTAR DE AMORA-PRETA*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.199-206, 31 dez. 2009. Universidade Federal do Parana. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v27i2.22029>.

CELANT, Viviane Marcela et al. PHENOLIC COMPOSITION AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF AQUEOUS AND ETHANOLIC EXTRACTS OF BLACKBERRIES. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 38, n. 2, e411, 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452016411>.

CHEN, Pei-ni et al. Cyanidin 3-Glucoside and Peonidin 3-Glucoside Inhibit Tumor Cell Growth and Induce Apoptosis In Vitro and Suppress Tumor Growth In Vivo. **Nutrition And Cancer**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.232-243, nov. 2005. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1207/s15327914nc5302_12.

CORY, Hannah et al. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. **Frontiers In Nutrition**, [s.l.], v. 5, p.1-9, 21 set. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>.

CROGE, Camila P. et al. Antioxidant Capacity and Polyphenolic Compounds of Blackberries Produced in Different Climates. **Hortscience**, [s.l.], v. 54, n. 12, p.2209-2213, dez. 2019. American Society for Horticultural Science. <http://dx.doi.org/10.21273/hortsci14377-19>.

DEWANTO, Veronica et al. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 10, p.3010-3014, maio 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf0115589>.

DING, Min et al. Cyanidin-3-glucoside, a Natural Product Derived from Blackberry, Exhibits Chemopreventive and Chemotherapeutic Activity. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 281,

n. 25, p.17359-17368, 17 abr. 2006. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m600861200>.

FERREIRA, Daniela Souza; ROSSO, Veridiana Vera de; MERCADANTE, Adriana Zerlotti. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.664-674, 8 out. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452010005000110>.

GOMES, Wesley Faria et al. Effect of freeze- and spray-drying on physico-chemical characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of papaya pulp. **Journal Of Food Science And Technology**, [s.l.], v. 55, n. 6, p.2095-2102, 19 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-018-3124-z>.

GONÇALVES, Natália Bonissi; PORTARI, Guilherme Vannuchi; JORDÃO, Alceu Afonso. Quantificação de compostos antioxidantes em frutos in natura e polpa congelada. **Journal Health Science Institute**, v. 37, n. 1, p. 73-6, 2019.

GOWD, Vemana; BAO, Tao; CHEN, Wei. Antioxidant potential and phenolic profile of blackberry anthocyanin extract followed by human gut microbiota fermentation. **Food Research International**, [s.l.], v. 120, p.523-533, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.001>.

HAIDA, Kimiyo S. et al. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Guava (*Psidium guajava*L.) Fresh and Frozen. **Revista Fitos**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.37-44, 2015. Fiocruz - Instituto de Tecnologia em Farmacos. <http://dx.doi.org/10.5935/2446-4775.20150004>.

HAIDA, Kimiyo Shimomura et al. Caracterização físico-química e atividade antioxidante de amoreira-preta (*Morus nigra* L.). **Revista Brasileira de Ciências da Saúde - Uscs**, [s.l.], v. 12, n. 40, p.21-27, 23 maio 2014. USCS Universidade Municipal de Sao Caetano do Sul. <http://dx.doi.org/10.13037/rbcs.vol12n40.2185>.

HÄKKINEN, Sari H. et al. Influence of Domestic Processing and Storage on Flavonol Contents in Berries. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 48, n. 7, p.2960-2965, jul. 2000. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf991274c>.

HALVORSEN, Bente L et al. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [s.l.], v. 84, n. 1, p.95-135, 1 jun. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/84.1.95>.

HIDALGO, Gábor-indra; ALMAJANO, María. Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination. **Antioxidants**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.7, 19 jan. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox6010007>.

HORSZWALD, Anna; JULIEN, Heritier; ANDLAUER, Wilfried. Characterisation of Aronia powders obtained by different drying processes. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 141, n. 3, p.2858-2863, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.103>.

JACQUES, Andresa Carolina et al. Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 8, p.1720-1725, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000800019>.

KE, Yuan et al. Total anthocyanins and cyanidin-3-O-glucoside contents and antioxidant activities of purified extracts from eight different pigmented plants. **Pharmacognosy Magazine**, [s.l.], v. 15, n. 60, p.124, 2019. Medknow. http://dx.doi.org/10.4103/pm.pm_162_18.

KUSKOSKI, E. Marta et al. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.691-693, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612004000400036>.

LAVEFVE, Laura; HOWARD, Luke R.; CARBONERO, Franck. Berry polyphenols metabolism and impact on human gut microbiota and health. **Food & Function**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.45-65, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c9fo01634a>.

LECOUR, S.; LAMONT, K. T.. Natural Polyphenols and Cardioprotection. **Mini-reviews In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 11, n. 14, p.1191-1199, 1 dez. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/13895575111091191>.

LEITÃO, A. M. **Estabilidade físico-química, microbiológica e sensorial de néctar de amora-preta (*Rubus spp.*), Cv. Tupy, embalado em polipropileno, no armazenamento.** 2007. 79f. 2007. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS.

LIANG, Tisong et al. Cyanidin-3-o-glucoside liposome: Preparation via a green method and antioxidant activity in GES-1 cells. **Food Research International**, [s.l.], v. 125, p.108648, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108648>.

MACHADO, Taiana Ferreira; MONTEIRO, Eduarda Rodrigues; TIECHER, Aline. Estabilidade química, físico-química e antioxidante de polpa de *Physalis* pasteurizada e não pasteurizada sob congelamento. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [s.l.], v. 22, e2017149, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.14917>.

MEDA, Aline et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 91, n. 3, p.571-577, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>.

MOTA, Renata Vieira da. Caracterização física e química de geléia de amora-preta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.539-543, set. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612006000300009>.

PEREIRA, Sónia R.; ALMEIDA, Leonor M.; DINIS, Teresa C.p.. Cyanidin-3-glucoside potentiates the anti-inflammatory and antioxidant activity of 5-aminosalicylic acid, in an in vitro model of inflammation. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 120, p.124-125, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.410>.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 26, n. 9-10, p.1231-1237, maio 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).

ROJAS-BARQUERA, Dayana; NARVÁEZ-CUENCA, Carlos-eduardo. Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas en Colombia. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 9, p.2336-2340, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000900019>.

SANTOS, Bruna Aparecida dos et al. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL DE POLPA DE FRUTAS ARMAZENADAS SOB CONGELAMENTO. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.1-13, 2019. Universidade Vale do Rio Verde (UninCor). <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v17i1.5049>.

SARTORI, Giliani Veloso; COSTA, Caroline Nunes da; RIBEIRO, Alessandra Braga. Phenolic content and antioxidant activity of frozen fruit pulp. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.23-29, 12 dez. 2014. Federal University of Technology - Parana. <http://dx.doi.org/10.14685/rebrapa.v5i3.143>.

SELLAPPAN, Subramani; AKOH, Casimir C.; KREWER, Gerard. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 8, p.2432-2438, abr. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf011097r>.

SERRA, Diana; ALMEIDA, Leonor M.; DINIS, Teresa C.p.. Anti-inflammatory protection afforded by cyanidin-3-glucoside and resveratrol in human intestinal cells via Nrf2 and PPAR- γ : Comparison with 5-aminosalicylic acid. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 260, p.102-109, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.11.003>.

SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M.. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Oxidants And Antioxidants Part A**, [s.l.], p.152-178, 1999. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)99017-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(99)99017-1).

- TIAN, Qingguo et al. Urinary Excretion of Black Raspberry (*Rubus occidentalis*) Anthocyanins and Their Metabolites. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 54, n. 4, p.1467-1472, fev. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf052367z>.
- TSUDA, Takanori et al. Oxidation products of cyanidin 3-O- β -d-glucoside with a free radical initiator. **Lipids**, [s.l.], v. 31, n. 12, p.1259-1263, dez. 1996. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02587910>.
- TSUDA, Takanori; HORIO, Fumihiko; OSAWA, Toshihiko. Absorption and metabolism of cyanidin 3-O- β -D-glucoside in rats. **Febs Letters**, [s.l.], v. 449, n. 2-3, p.179-182, 23 abr. 1999. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00407-x.v](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00407-x.v)
- VITAGLIONE, Paola et al. Protocatechuic Acid Is the Major Human Metabolite of Cyanidin-Glucosides. **The Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 137, n. 9, p.2043-2048, 1 set. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jn/137.9.2043>.
- VIZZOTTO, Márcia et al. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.853-858, set. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452012000300027>.
- WEN, Yao et al. A polyamide resin based method for adsorption of anthocyanins from blackberries. **New Journal Of Chemistry**, [s.l.], v. 40, n. 4, p.3773-3780, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6nj00054a>.
- WEN, Yao et al. Optimization of the microwave-assisted extraction and antioxidant activities of anthocyanins from blackberry using a response surface methodology. **Rsc Advances**, [s.l.], v. 5, n. 25, p.19686-19695, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c4ra16396f>.
- WU, Xianli; PITTMAN, Hoy E.; PRIOR, Ronald L.. Fate of Anthocyanins and Antioxidant Capacity in Contents of the Gastrointestinal Tract of Weanling Pigs Following Black Raspberry Consumption. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, S.l., v. 54, n. 2, p.583-589, 22 dez. 2005. American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/jf052108+>.
- WU, Xianli; PRIOR, Ronald L.. 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**, [s.l.], v. 53, n. 7, p.2589-2599, abr. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf048068b>.
- ZANATTA, Cinthia Fernanda et al. Determination of Anthocyanins from Camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 53, n. 24, p.9531-9535, nov. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf051357v>.

ZHANG, Lixia et al. Compositions of anthocyanins in blackberry juice and their thermal degradation in relation to antioxidant activity. **European Food Research And Technology**, [s.l.], v. 235, n. 4, p.637-645, 5 ago. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-012-1796-6>.