



PAULA BECKER PERTUZATTI KONDA

**PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT
CAPACITY IN BLUEBERRY SPECIES PRODUCED IN
BRAZIL**

***COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE EM ESPÉCIES DE MIRTILO
PRODUZIDAS NO BRASIL***

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PAULA BECKER PERTUZATTI KONDA

**PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN
BLUEBERRY SPECIES PRODUCED IN BRAZIL**

**COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE
EM ESPÉCIES DE MIRTILO PRODUZIDAS NO BRASIL**

Thesis presented to the Faculty of
Food Engineering of the University
of Campinas in partial fulfillment of
the requirements for the degree of
Ph.D. in Food Science.

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Doutora
em Ciência de Alimentos.

Supervisor/*Orientadora*: Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy

Co-supervisor/*Co-orientador*: Prof. Dr. Isidro Hermosín-Gutiérrez

Este exemplar corresponde à versão
final da tese defendida pela aluna Paula
Becker Pertuzatti Konda e orientada
pela Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy

Assinatura do Orientador(a)

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

K836c Konda, Paula Becker Pertuzatti, 1984-
Compostos fenólicos e capacidade antioxidante em espécies de mirtilo produzidas no Brasil / Paula Becker Pertuzatti Konda. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Helena Teixeira Godoy.
Coorientador: Isidro Hermosín-Gutiérrez.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Mirtilos. 2. Antioxidantes. 3. Fenólicos. 4. Análise de componentes principais. I. Godoy, Helena Teixeira. II. Hermosín-Gutiérrez, Isidro. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Phenolic compounds and antioxidant capacity in blueberry species produced in Brazil

Palavras-chave em inglês:

Blueberries

Antioxidants

Phenolics

Principal component analysis

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Helena Teixeira Godoy [Orientador]

Cristiano Augusto Ballus

Daniele Rodrigues

Juliana Azevedo Lima Pallone

Milene Teixeira Barcia

Data de defesa: 28-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
(Orientadora)

Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone
(Membro Titular)
FEA-DCA-UNICAMP

Dr. Cristiano Augusto Ballus
(Membro Titular)
FEA-DCA-UNICAMP

Dra. Daniele Rodrigues
(Membro Titular)
MAX-FAJ

Dra. Milene Teixeira Barcia
(Membro Titular)
EQA-FURG

Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore
(Membro Suplente)
FEA-DCA-UNICAMP

Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer
(Membro Suplente)
UEM

Prof. Dr. Rodrigo Scherer
(Membro Suplente)
UVV

ABSTRACT

The blueberry production began in Brazil at 80's and your commercialization at 90's, despite being a new crop in the country, it is observed that each day the fruit has been gaining ground, which led to an increase the number of producers and cultivars marketed. Due to this, the objective of this study was to analyze different cultivars produced by different producers, for antioxidant capacity and anthocyanins, flavonols and chlorogenic acid levels. Hydrophilic and lipophilic extracts were prepared for thirty samples from 10 blueberry cultivars in two harvests, 2010/2011 and 2011/2012, and four different producers. Antioxidant capacity was measured by the ABTS, FRAP, ORAC and β -carotene/linoleate methods and correlated to the amounts of carotenoids, total phenolics and anthocyanins. The hydrophilic extracts showed a higher positive correlation, between the amounts of bioactive compounds and the antioxidant capacity, compared to lipophilic extracts, which differentiated by principal component analysis according to whether they were Rabbiteye or Highbush. Already, in the hydrophilic extracts there was a separation by producers and harvest seasons. The flavonols, chlorogenic acid and anthocyanins content of blueberries were determined by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ and we observed that all cultivars showed high concentration of chlorogenic acid, average values ranged between 0.2 e 4.0 g / kg dry matter, were also found forty four flavonols, and the main in Highbush blueberry was quercetin 3-galactosídeo, while the fruits of Rabbiteye group presented in high proportions quercetin 3-ramnosídeo and quercetin 3-glucuronide. Among the flavonols identified, quercetin-3-O-[4''-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)]- α -rhamnose was found, for the first time in blueberries, it was detected only in Florida and Powderblue cultivars, where was a major flavonol. Apart from this compound, isorhamnetin, siringetin and laricitrin derivatives, were also reported for the first time in blueberries. Were identified 36 anthocyanins, there were also differentiation in the majority anthocyanin according to the blueberry group. The cultivars of Rabbiteye group showed higher amounts of cyanidin 3-galactoside than cultivars of Highbush group, while Highbush cultivars have more 3-O-arabinoside of delphinidin and malvidin.

Keywords: blueberry, antioxidant, phenolics, principal component analysis

RESUMO

A produção de mirtilos iniciou-se no Brasil na década de 80 e a comercialização da fruta na década de 90. Apesar de ser um cultivo novo no país, observa-se que a cada dia o fruto tem ganhado mais espaço, o que fez com que aumentasse o número de produtores e cultivares comercializadas. Deste modo, o presente trabalho teve por objetivo analisar cultivares comercializadas por diferentes produtores, quanto a sua capacidade antioxidante e teor de antocianinas, flavonóis e ácido clorogênico. Foram elaborados um extrato hidrofílico e um extrato lipofílico para as trinta amostras, pertencentes a 10 cultivares de mirtilo da safra de 2010/2011 e 2011/2012 de quatro diferentes produtores e sua capacidade antioxidante foi medida pelos métodos de ABTS, FRAP, ORAC e β -caroteno/ácido linoleico e correlacionadas com o teor de antocianinas, compostos fenólicos e carotenoides totais. Os extratos hidrofílicos apresentaram uma maior correlação positiva, entre o teor de compostos bioativos e os métodos de capacidade antioxidante, do que os extratos lipofílicos, os quais se diferenciaram na análise de componentes principais de acordo com o grupo que pertenciam, Rabbiteye ou Highbush. Enquanto, nos extratos hidrofílicos houve uma separação quanto aos produtores e safras analisados. Através de HPLC-DAD-ESI-MSⁿ, foi determinado o conteúdo de flavonóis, ácido clorogênico e antocianinas nos mirtilos e observou-se que todas as cultivares apresentam grandes quantidades de ácido clorogênico. Em média os valores oscilaram entre 0,2 e 4,0 g / kg de fruta seca, também foram encontrados quarenta e quatro flavonóis, sendo os majoritários no grupo Highbush, quercetina 3-galactosídeo, enquanto os frutos do grupo Rabbiteye apresentam em maior quantidade quercetina 3-rhamnosídeo e quercetina 3-glucuronídeo. Dentre os flavonóis identificados, encontrou-se quercetina-3-O-[4''-(3-hidroxi-3-metilglutaroil)]- α -rhamnose, pela primeira vez em mirtilos, sendo este composto exclusivo das cultivares Florida e Powderblue. Além deste composto, derivados da isorhamnetina, siringetina e laricitrina, foram encontrados pela primeira vez no mirtilo. Quanto as antocianinas foram encontradas trinta e seis, havendo também um diferenciação na antocianina majoritária, de acordo com o grupo de mirtilo. As cultivares do grupo Rabbiteye apresentaram maiores quantidades de cianidina 3-galactosídeo, enquanto as cultivares do grupo Highbush possuem maiores quantidades de arabinosídeos de delfinidina e malvidina.

Palavras-chave: mirtilo, antioxidantes, fenólicos, análise de componentes principais

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	xix
LISTA DE FIGURAS.....	xxi
LISTA DE TABELAS.....	xxiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
OBJETIVOS.....	5
Objetivo Geral.....	5
Objetivos Específicos.....	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
1 Mercado produtor e consumidor, importância da produção de mirtilo no brasil e no mundo.....	9
2 Cultivares Produzidas.....	11
3 Composição Química.....	14
4 Compostos fenólicos.....	20
4.1 Ácidos Fenólicos.....	23
4.2 Flavonóis.....	25
4.3 Elagitaninos.....	28
4.4 Proantocianidinas.....	28
4.5 Antocianinas.....	29
5 Carotenoides.....	35
6 Capacidade antioxidante.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ARTIGO 1	55
ABSTRACT.....	58
1 INTRODUCTION.....	59
2 MATERIALS AND METHODS.....	60
2.1 Chemicals and Reagents.....	60
2.2 Sample.....	60
2.3 Preparation of extracts.....	61
2.4 Determination of Total Phenolics (TPH).....	61
2.5 Determination of Total Anthocyanins (ACY).....	61
2.6 Determination of Total Carotenoids.....	62
2.7 Determination of the antioxidant activity.....	62
2.7.1 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).....	62

2.7.2 Free radical capture ABTS.....	62
2.7.3 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC).....	62
2.7.4 β -carotene/linoleic acid model system.....	63
2.8 Statistical analysis	63
3 RESULTS AND DISCUSSION	64
4 CONCLUSION	77
5 ACKNOWLEDGEMENTS.....	77
6 REFERENCES.....	77
ARTIGO 2	83
ABSTRACT	86
1 INTRODUCTION.....	87
2 MATERIAL AND METHODS	88
2.1 Chemicals and Reagents	88
2.2 Samples.....	88
2.3 Biometric Measurements	90
2.4 Sample preparation for analysis of anthocyanins.....	90
2.5. Determination of anthocyanins by HPLC-DAD-ESI-MS ⁿ	90
2.6. Statistical analysis	91
3 RESULTS AND DISCUSSION	92
4 CONCLUSIONS.....	104
5 ACKNOWLEDGEMENTS.....	104
6 REFERENCES.....	105
ARTIGO 3	111
RESUMO	114
1 INTRODUÇÃO	115
2 MATERIAIS E MÉTODOS	116
2.1 Reagentes	116
2.2 Amostras	116
2.3 Preparo dos extratos para análise de compostos fenólicos	117
2.4 Determinação de compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI-MS ⁿ	118
2.5 Análise Estatística	119
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
3.1 Composição de compostos fenólicos.....	120
4 CONCLUSÃO	135
5 AGRADECIMENTOS	135
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
CONCLUSÕES GERAIS	139

APÊNDICES	141
------------------------	------------

“ São as nossas escolhas, ..., que revelam o que
realmente somos, muito mais do que nossas
qualidades ”

(Albus Dumbledore)

DEDICO

*Aos meus pais, Milton e Carla, e minha avó Silvia, que investiram seu tempo e recursos
na minha educação, possibilitando minha chegada até aqui.*

*Ao meu marido Danilo, meu companheiro de todas as horas, meu auxílio e meu amparo
nos momentos difíceis.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, pela oportunidade de vida e por me dar competência para realizar o trabalho;

À minha família, que sempre me apoiou, incentivou e torceu por mim, em todos os momentos;

Ao meu marido, Danilo, por todo amor, incentivo e apoio nos momentos mais difíceis;

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Ciência de Alimentos da UNICAMP, pela grande oportunidade de realização do doutorado;

À minha orientadora, Professora Dra Helena Teixeira Godoy, por todos os ensinamentos, conselhos, momentos divertidos, por ter apoiado minha escolha de deixar de dedicar-me exclusivamente ao doutorado e realizá-lo simultaneamente com o meu trabalho e por toda ajuda oferecida nestes anos, sempre terás minha gratidão e amizade;

Ao meu co-orientador, Professor Dr Isidro Hermosín-Gutiérrez, por ter me aceitado em seu laboratório, por todos os ensinamentos, gentilezas, amizade e exemplos de humildade, Gracias;

À banca examinadora, pelas contribuições e sugestões para a melhoria do trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo auxílio financeiro nos primeiros semestres;

À Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), pelo apoio para a realização do doutorado, especialmente aos professores e amigos, Paulo Jorge, Mércia, Luciana e Gilberto, aos amigos que construí nestes anos em Barra do Garças, à todas minhas ex-orientandas pela compreensão nos momentos de distância e especialmente a Pollyanna pelo auxílio na execução das análises;

À minha grande amiga/madrinha, Milene Teixeira Barcia, pela ajuda na realização de TODAS as análises, inclusive durante finais de semana, noites, madrugadas e feriados, no Brasil e na Espanha, minha eterna amizade;

Às minhas amigas, do lado B, Dani Bio e Vivi, por todos os momentos divertidos que passamos juntas, seja em uma bancada de laboratório as 2h da manhã, ou em uma mesa de bar e ao Batata, por ser o responsável pela trilha sonora destes anos;

Às minhas amigas do apê, Leandra, Milene, Dani, Rita, Meg e Georgia, primeiro por terem me acolhido para ser uma moradora permanente e depois por terem me acolhido para ser uma moradora temporária, obrigada pelos anos que compartilhamos. E ao meu amigo Marcio, por toda ajuda;

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos, Dani, Vivi, Cris, Dri, Carol, Milene, Marla, Carlos, Janclei, Chico, Sabrina, Polly, Elenice, Thaís, Wellington, Taysse, Daniela, Maria Rosa, Danilo e Mateus, por todos os momentos que passamos juntos;

Aos técnicos do Laboratório de Análise de Alimentos, especialmente ao Seu Dirceu, a quem dei muito trabalho por sujar, talvez milhares, de vidrarias e a minha amiga Renata, por toda ajuda recebida e também pelo bate-papo e brigadeiros que ajudaram a aguentar os dias longos;

Aos amigos que conheci na Universidad Castilla-La Mancha, Ligia, Maria e Sergio, por toda a ajuda nas análises;

Aos professores e técnicos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pelos ensinamentos e apoio;

A todos, amigos, conhecidos, colegas de trabalho e alunos que de alguma forma, mesmo que indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Paula

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 Estrutura de alguns dos principais flavonoides encontrados no mirtilo. (a) quercetina, (b) catequina, (c) miricetina, (d) epicatequina, (e) kaempferol, (f) antocianidina; R1 e R2 na figura (f) podem ser H, OH ou OCH₃ dependendo da antocianidina..... 21

Figura 2 Estrutura dos ácidos fenólicos. (a) ácido hidroxibenzóico, (b) ácido hidroxicinâmico; 2,3,4,5 e 6 encontram-se na Tabela 5. 23

Figura 3. Estrutura química das antocianinas e antocianidinas. Os radicais encontram-se na Tabela 8, com suas identificações..... 30

ARTIGO 1

Figure 1.1 Principal component analysis (PCA) of hydrophilic extracts of different blueberry cultivars. Percentages of four products and two harvests, (a) Graph of scores for PC1 (factor 1) and PC2 (factor 2), differences between classes (producers); (b) Graph of loadings for PC1 (factor 1) and PC2 (factor 2); (c) Graph of scores for PC3 (factor 3) and PC4 (factor 4); (d) Graph of loadings for PC3 (factor 3) and PC4 (factor 4); (e) Graph of scores for PC1 (factor 1) and PC2 (factor 2), differences between class (harvest). *PhC = Phenolic compounds..... 72

Figure 1.2 Principal component analysis (PCA) of lipophilic extracts of blueberry cultivars. Percentages of four products and two harvests, (a) Graph of scores for PC1 (factor 1) and PC2 (factor 2), (b) Graph of loadings. 76

ARTIGO 2

Figure 2.1 HPLC-chromatographic profile of anthocyanins present in four blueberry cultivars: a) Bluecrop Bc-2 2011/2012 harvest; b) Elliot E-2 2011/2012 harvest c) Florida F-2 2011/2012 harvest; d) Briteblue Bb-3 2011/2012 harvest..... 101

Figure 2.2 Principal component analysis (PCA) of blueberry cultivars. (a) Graph of scores for PC1 (factor 1) and PC2 (factor 2) showing Rabbiteye and Highbush separation, (b) Graph of loadings, (c) Graph of scores for PC1 (factor 1) and PC2 (factor 2) showing the separation to Profile A, B, C and D (Figure 2.1 (a), 2.1 (b), 2.1 (c) and 2.1 (d), respectively). Anthocyanin assignation (Table 2.2). 103

ARTIGO 3

Figura 3.1 Perfil cromatográfico de flavonóis presentes em quatro cultivares de mirtilo Highbush produzidos em Vacaria: a) Bluecrop (Bc-4); b) Coville (Co-2); c) Darrow (D-4); d) Elliot (E-2); Os picos estão numerados de acordo com a tabela 2; Picos com números em vermelho são derivados da miricetina; Picos em preto são derivados da quercetina; Picos em azul são derivados da laricitrina; Picos em verde são derivados da siringetina; Picos em roxo são derivados da isorhamnetina; Pico em laranja derivado do Kaempferol. 123

Figura 3.2 Perfil cromatográfico de flavonóis presentes em seis cultivares de mirtilo Rabiteye: a) Briteblue (Bb-3); b) Bluegem (Bg-2); c) Climax (C-3); d) Florida (F-2); e) Powderblue (Pb-2); f) Woodard (W-3); Os picos estão numerados de acordo com a tabela 2; Picos com números em vermelho são derivados da miricetina; Picos em preto são derivados da quercetina; Picos em azul são derivados da laricitrina; Picos em verde são derivados da siringetina; Picos em roxo são derivados da isorhamnetina. 124

Figura 3.3 Dados de espectrometria de massas do composto 38, quercetina-3-O-[4''-(3-hydroxi-3-metilglutaroil)]- α -rhamnose. 133

Figura 3.4 Análise de componentes principais (PCA) nas cultivares de mirtilo pertencentes aos quatro produtores e duas safras, (a) Gráfico de scores para PC1 (fator 1) e PC2 (fator 2), diferenças entre classes (espécies); (b) Gráfico de loadings para PC1 (fator 1) e PC2 (fator 2), identificação dos picos, pode ser visualizada na (Tabela 3.2). 135

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Cultivares, grupos e características de mirtilos testados na América do Sul..	12
Tabela 2. Composição centesimal de algumas cultivares de mirtilo Rabbiteye em comparação com o grupo Highbush	15
Tabela 3. Conteúdo de vitaminas no mirtilo	19
Tabela 4. Conteúdo (mg/100g fruta fresca) de compostos fenólicos e antocianinas em mirtilo	22
Tabela 5. Padrão de substituição dos ácidos fenólicos	23
Tabela 6. Total de ácidos fenólicos no mirtilo (mg/kg)	24
Tabela 7. Composição de flavonóis em mirtilo	27
Tabela 8. Grupamentos ligados aos radicais para formação de antocianinas e antocianidinas	31
Tabela 9. Composição de antocianinas em mirtilo	32
Tabela 10. Capacidade antioxidante de compostos fenólicos e vitamina C em mirtilos	38

ARTIGO 1

Table 1.1 Cultivars, species and producers of Brazilian blueberries, with their respective cities.	60
Table 1.2 Total phenolics and anthocyanins in hidrophilic extracts of blueberries.	65
Table 1.3 Antioxidant activity of hydrophilic extracts of blueberries, using the ABTS, FRAP, ORAC and β -carotene/linoleate model systems.	70
Table 1.4 Concentration of total carotenoids and antioxidant activity of lipophilic extracts of blueberries, determined by the ABTS and ORAC methods.	75

ARTIGO 2

Table 2.1 Different blueberries cultivars, groups and producers, with their respective locations of origin.	89
Table 2.2 Retention times and Mass Spectral (positive ionization mode) and UV-Vis data of anthocyanins identified in blueberries	94

Table 2.3 Anthocyanin Profile (Molar Percentage of Each Anthocyanin) and Total Anthocyanin Content (g/kg DW, as Malvidin 3-Glucoside Equivalents) of Different Blueberries Cultivars from 2010/2011 Harvest.....	98
--	----

Table 2.4 Anthocyanin Profile (Molar Percentage of Each Anthocyanin) and Total Anthocyanin Content (g/kg DW, as Malvidin 3-Glucoside Equivalents) of Different Blueberries Cultivars from 2011/2012 Harvest.....	100
--	-----

ARTIGO 3

Tabela 3.1 Cultivares, espécies e produtores dos mirtilos analisados, com suas respectivas cidades.....	117
---	-----

Tabela 3.2 Tempo de retenção e dados espectrais dos flavonóis e ácido clorogênico identificos em mirtilos	121
---	-----

Tabela 3.3 Perfil de flavonóis (Porcentagem molar de cada flavonol individual) e conteúdo total de flavonóis (g/kg FS, como equivalente de quercetina 3-glicosídeo) e ácido clorogênico (g/kg FS, como equivalente de ácido clorogênico) de diferentes cultivares de mirtilo pertencentes a safra de 2010/2011.....	125
---	-----

Tabela 3.4 Perfil de flavonóis (Porcentagem molar de cada flavonol individual) e conteúdo total de flavonóis (g/kg FS, como equivalente de quercetina 3-glicosídeo) e ácido clorogênico (g/kg FS, como equivalente de ácido clorogênico) de diferentes cultivares de mirtilo pertencentes a safra de 2011/2012.....	127
---	-----

INTRODUÇÃO GERAL

As pequenas frutas cultivadas nas regiões de clima temperado tem despertado cada vez mais o interesse dos consumidores e dos produtores. Em crescente avanço mundial, o cultivo do morango, amora, framboesa, “cranberry” e mirtilo vem ganhando espaço em diversos países, contribuindo significativamente para a disponibilidade de frutas vermelhas. Segundo Strik (2007) em 2005, havia mais de 1,8 milhões de hectares de lavouras de pequenas frutas em todo mundo, produzindo 6,3 milhões de toneladas de frutas.

O Brasil possui uma condição climática privilegiada para tais culturas por apresentar regiões de clima temperado em quatro estados brasileiros, incluindo o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo. Dessa forma, o país apresenta potencial de produção durante quase todo o ano. Além disso, outro aspecto economicamente relevante é que a produção brasileira dessas frutas ocorre de dezembro a fevereiro, período de entressafra dos Estados Unidos e União Européia, os principais centros consumidores.

As pequenas frutas, são universalmente reconhecidos como tendo uma composição química básica que acentua o seu sabor doce, aroma frutado e propriedades benéficas a saúde, que são apreciadas em todo o mundo. Esta pode ser altamente variável, dependendo da cultivar, estágio de maturação e colheita e das condições de armazenamento, geralmente por causa de sua natureza não climatérica no que diz respeito à sua produção e capacidade de resposta ao etileno (Strik, 2007).

Com relação ao mirtilo, uma pequena fruta nativa da América do Norte, sua cultura ainda é recente e pouco conhecida no Brasil, porém as pesquisas têm se intensificado cada vez mais, com o intuito de verificar a adaptabilidade às condições climáticas do país (Raseira & Antunes, 2004).

Atenção especial começou a ser dada ao mirtilo a partir do trabalho de Prior (1998), onde ao comparar quarenta frutas e hortaliças, o mirtilo apresentou o maior valor de capacidade antioxidante, despertando deste modo o interesse de consumidores e pesquisadores. No entanto, a maioria das pesquisas relaciona esta elevada capacidade antioxidante com o conteúdo de compostos fenólicos no fruto, principalmente antocianinas, por serem os pigmentos majoritários (Wang et al., 2012).

Dentro da classe dos compostos fenólicos, o mirtilo apresenta-se como uma rica fonte de flavonoides, antocianinas, flavonóis e ácidos hidroxicinâmicos (Rodriguez-Mateos et al., 2012), os quais estão relacionados na literatura com efeitos benéficos à saúde, muitas vezes devido a sua habilidade em atuar como antioxidantes, frente aos radicais livres, evitando vários tipos de câncer (Nile & Park, 2014). Roopchand et al. (2013) observaram que os polifenóis do mirtilo podem ser utilizados em dietas para diabéticos, pois diminuíram os níveis de glicose no sangue, reduziram o colesterol e contribuíram para a redução do ganho de peso em ratos.

Estudos realizados com mirtilo observaram que, além da presença dos compostos fenólicos, outros compostos como carotenoides, tocoferóis e ácido ascórbico também estão presentes na fruta, sendo encontrados algumas vezes em quantidades elevadas (Barcia et al. 2010; Pertuzatti et al., 2012). Estes compostos também podem ter influência na capacidade antioxidante do fruto, tendo em vista, que a capacidade antioxidante de carotenoides foi reportada previamente na literatura (Muller & Boehm, 2011; Gurak et al., 2014), assim como para os tocoferóis e ácido ascórbico (McAnulty et al., 2004; Mancebo-Campos et al., 2014).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barcia, M. T., Jacques, A. C., Pertuzatti, P. B. & Zambiasi, R. C. (2010). Determination by HPLC of ascorbic acid and tocopherols in fruits. *Semina: Ciências Agrárias*, 31, 381-390.
- Gurak, P. D., Mercadante, A. Z., González-Miret, M. L., Heredia, F. J. & Meléndez-Martínez, A. J. (2014). Changes in antioxidant capacity and colour associated with the formation of b-carotene epoxides and oxidative cleavage derivatives. *Food Chemistry*, 147, 160-169.
- Mancebo-Campos, V., Salvador, M. D. & Fregapane, G. (2014). Antioxidant capacity of individual and combined virgin olive oil minor compounds evaluated at mild temperature (25 and 40 °C) as compared to accelerated and antiradical assays. *Food Chemistry*, 150, 374-381.
- Mcanulty, S. R., Mcanulty, L. S., Nieman, D. C., Dumke, C. L., Morrow, J. D., Utter, A. C., Henson, D. A., Proulx, W. R. & George, G. L. (2004). Consumption of blueberry polyphenols reduces exerciseinduced oxidative stress compared to vitamin C. *Nutrition research*, 24, 209-221.
- Mueller, L. & Boehm, V. (2011). Antioxidant activity of b-carotene compounds in different in vitro assays. *Molecules*, 16, 1055–1069.
- Nile, S. H. & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30, 134-144.
- Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Jacques, A. C., Vizzotto, M., Godoy, H. T. & Zambiasi, R. C. (2012). Quantification of several bioactive compounds and antioxidant

- activities of six cultivars of brazilian blueberry. *The Natural Products Journal*, 2, 188-195.
- Prior, R. L. (1998). Antioxidant capacity and health benefits of fruits and vegetables: blueberries, the leader of the Pack. Proc 32nd Ann. Open House North Carolina Blueberry Council 32, 3-12.
- Raseira, M., C., B. & Antunes, L., E., C. (2004). A Cultura do Mirtilo. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, documento 121, 29-36. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/744895>>. Acesso em: 08 mar. 2014, 13:48.
- Rodriguez-Mateos, A., Cifuentes-Gomez, T., Tabatabaee, S., Lecras, C. & Spencer, J. P. E. (2012). Procyanidin, Anthocyanin, and Chlorogenic Acid Contents of Highbush and Lowbush Blueberries *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5772-5778.
- Roopchand, D. E., Kuhn, P., Rojo, L. E., Lila, M. A. & Raskin, I. (2013). Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice. *Pharmacological Research*, 68, 59-67.
- Strik, B. C. (2007) *Berry crops: Worldwide area and production systems* In: Zhao, Y. (2007). *Berry Fruit Value-Added Products for Health Promotion*, CRC PRESS, Taylor and Francis Group.
- Wang, S. Y., Chen, H., Camp, M. J. & Ehlenfeldt, M. K. (2012). Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). *Food Chemistry*, 132, 855-864.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar dez cultivares de mirtilo, Elliot, Florida, Bluecrop, Climax, Powderblue, Bluegem, Briteblue, Woodard, Darrow e Coville, produzidas e comercializadas por quatro diferentes produtores brasileiros, durante duas safras, 2010/2011 e 2011/2012, quanto a sua capacidade antioxidante e teor de antocianinas, flavonóis e ácido clorogênico.

Objetivos Específicos

- 1) Preparar extratos hidrofílicos e lipofílicos das 30 amostras de mirtilo, pertencentes as diferentes cultivares, produtores e safras;
- 2) Determinar o teor de compostos fenólicos e antocianinas totais nos extratos hidrofílicos de mirtilo e o teor de carotenoides totais nos extratos lipofílicos;
- 3) Determinar a capacidade antioxidante dos extratos por diferentes métodos, ORAC, FRAP, ABTS e β -caroteno/ácido linoleico, para os extratos hidrofílicos, e ORAC e ABTS para os extratos lipofílicos;
- 4) Identificar e quantificar os flavonóis, antocianinas e ácido clorogênico presente nos mirtilos, por HPLC-DAD-ESI-MSⁿ (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplada a Espectrometria de Massas);
- 5) Utilizar a Análise de Componentes Principais (PCA), como método estatístico para identificar a relação entre as características extraídas dos dados e separá-los.

Objetivos

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Mercado produtor e consumidor, importância da produção de mirtilo no Brasil e no mundo

De acordo com as estatísticas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), de 1970 até 2011 a produção mundial de mirtilo aumentou aproximadamente 7 vezes (FAOSTAT, 2012). Segundo dados do *National Agricultural Statistics Service* (NASS) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), os Estados Unidos são os principais produtores de mirtilo com uma produção de aproximadamente 454 toneladas da fruta em 2012, o que torna o mirtilo a segunda pequena fruta mais produzida e comercializada no país, atrás apenas do morango (USDA-NASS, 2013). O segundo principal produtor de mirtilo é o Canadá com 31,5 % da produção mundial (FAOSTAT, 2012). O continente europeu é responsável por 10,4% e os demais países do mundo são responsáveis por 2,9 % da produção mundial (FAOSTAT, 2012).

O cultivo do mirtilo (*Vaccinium* spp.) está em franca expansão em países da América do Sul, como Chile que possui 2550 hectares (ha) plantados, Argentina com 1500 ha e Uruguai com 200 ha (Bañados, 2006; Fachinello, 2008) áreas caracterizadas por não ter um inverno com frio muito intenso e por ter um verão quente (Bañados, 2008). O aumento na produção de mirtilo em países do hemisfério sul, é devido em grande parte a demanda dos países do hemisfério norte, por mirtilos frescos na sua entressafra, o que gera uma oportunidade de negócio muito interessante para o setor produtivo brasileiro (Antunes et al., 2007, Pertuzatti et al., 2012).

No Brasil, o cultivo do mirtilo ainda é recente e pouco conhecido. As primeiras plantas foram trazidas da Universidade da Flórida (Estados Unidos) em 1980 pela EMBRAPA - Clima Temperado (Pelotas-RS), para avaliação de variedades, sendo introduzidas coleções de cultivares de baixa exigência em frio, pertencentes ao grupo

“Rabbiteye”, por ser o grupo mais adaptável as condições do sul do Brasil (Sharpe, 1980). A primeira iniciativa comercial no País começou a partir de 1990, em Vacaria (RS), através da introdução de variedades do grupo “Highbush” (Antunes & Raseira, 2006; Moraes et al., 2007). Atualmente, predominam as cultivares pertencentes ao grupo “Rabbiteye”. O quadro produtivo atual, no país, está concentrado principalmente nas cidades de Vacaria no Rio Grande do Sul e Campos do Jordão em São Paulo (Madail & Santos, 2004), perfazendo uma área cultivada superior a 150 hectares (Fachinello, 2008). No entanto, o mercado consumidor nacional ainda é muito restrito, tendo São Paulo e Rio de Janeiro como os principais consumidores.

Em relação ao mercado consumidor mundial, os Estados Unidos possuem os maiores índices de consumo, com elevada demanda, que fez com que o consumo per capita aumentasse cerca de 50% nos últimos quinze anos (Demchak, Harper & Kime 2014). Segundo Madail e Santos (2004) os norte-americanos importam cerca de 82% da produção do restante do mundo. Apesar de ser o maior produtor da fruta, o país não é auto-suficiente e, exceto nos meses de maio, junho e julho (período de safra), depende diretamente do abastecimento canadense, chileno, neozelandês e argentino.

O mirtilo é uma das pequenas frutas mais consumidas no mundo, além do seu sabor muito apreciado, e cor azul que faz com que a fruta tenha alta aceitação entre crianças e adolescentes, a fruta ganhou muita atenção nos últimos anos depois que o trabalho de Prior (1998) relatou que o mirtilo tinha a maior capacidade antioxidante dentre 42 frutas e hortaliças avaliadas. Esta descoberta provocou numerosas investigações científicas sobre as propriedades químicas do fruto e sua correlação com benefícios a saúde.

2 Cultivares Produzidas

O mirtilo é membro da família *Ericaceae*, subfamília *Vaccinoideae* e gênero *Vaccinium*, e seus frutos podem ser classificados em três grupos principais: “Highbush”, “Lowbush” e “Rabbiteye” (Sousa et al., 2007; Strik & Finn, 2014).

O grupo “Highbush” é originário da costa oeste da América do Norte e dentro dele predomina a espécie *V. corymbosum* L., ainda que as espécies *V. australe* e *V. darrowi* possam ser usadas para fins de melhoramento genético (Hoffmann, 2002), suas plantas possuem uma necessidade de 650 a 850h de frio (com temperaturas menores ou iguais a 7,2°C) e os frutos apresentam a melhor qualidade, tanto em tamanho e sabor quanto com relação ao teor de pruína (cera responsável pela coloração azul dos frutos) (Raseira & Antunes, 2004).

Os mirtilos do grupo Highbush, podem ser divididos em Northern Highbush, que é o tipo mais comumente plantado no mundo, com uma exigência de frio de mais de 800h, e Southern Highbush, ou Highbush de baixa necessidade de frio (200 a 300h), desenvolvido para permitir a produção de mirtilo em regiões com invernos mais brandos (Strik & Finn, 2014). Segundo Galletta e Ballington (1996), Southern Highbush tem melhor desempenho nos planaltos, solos pobres em matéria orgânica, melhor resistência à doenças e produzem frutos grandes de excelente qualidade. Estes frutos possuem uma produção bastante precoce em relação aos outros grupos. São cultivados nas regiões menos frias dos Estados Unidos, no Chile e predominam na Argentina e Uruguai. No Brasil, as primeiras experiências de cultivo são recentes, se concentram em Vacaria, na região de Pelotas e na Serra Gaúcha.

As cultivares que pertencem a esse grupo foram desenvolvidas a partir de hibridações interespecífica entre o mirtilo Highbush (*Vaccinium corymbosum*), o mirtilo sempre verde (*Vaccinium darrowi*) e o mirtilo Rabbiteye (*Vaccinium ashei* Reade) (Galletta & Ballington, 1996), e estão apresentadas na **Tabela 1**, juntamente com outras cultivares do grupo Highbush e do grupo Rabbiteye.

Tabela 1. Cultivares, grupos e características de mirtilos testados na América do Sul
(continua)

Cultivar	Grupo	Característica	Referência
Bluecrop	Highbush	Criada pelo USDA – New Jersey, tamanho de médio a grande, azul claro, sabor ácido, polpa firme, requerimento mais de 600 h de frio	1
O’Neal	Highbush	Originária da Carolina do Norte, requerimento 200 – 600 h de frio, tamanho grande, azul claro, maturação precoce	2
Georgiagem	Highbush	Originária da Geórgia, requerimento 200 – 600 h de frio, tamanho médio	2
Misty	Highbush	Originária da Flórida, requerimento 150 – 200 h de frio, tamanho grande, azul claro, polpa firme, maturação precoce	2,3
Sharpblue	Highbush	Originária da Flórida, tamanho médio, azul escuro, polpa medianamente firme, maturação precoce	3
Millenia	Highbush	Originária da Flórida, tamanho médio, azul claro, polpa firme, requerimento 300 h de frio	3
Star	Highbush	Originária da Flórida, tamanho grande, azul escuro, polpa firme, requerimento 400 h de frio	2
Elliot	Highbush	Tamanho médio, azul claro, maturação tardia, requerimento mais de 800 h frio	1
Darrow	Highbush	Tamanho de grande a muito grande, azul claro, polpa medianamente firme	1
Coville	Highbush	Tamanho grande, polpa firme, requerimento mais de 800 h frio	4
Brigitta Blue	Highbush	Tamanho grande, azul claro, polpa firme, requerimento mais de 700 h frio	1,4
Aliceblue	Rabbiteye	Originária da Flórida, baixa exigência em frio, sabor equilibrado entre acidez e açúcar, película azulada	3
Bluebelle	Rabbiteye	Originária da Geórgia, polpa firme, tamanho pequeno a médio, presença moderada de pruína	3
Bluegem	Rabbiteye	Originária da Flórida, bastante pruína na superfície	3
Briteblue	Rabbiteye	Originária da Geórgia, tamanho grande, azul clara, polpa firme	2
Delite	Rabbiteye	Originária da Geórgia, tamanho pequeno, sabor doce-ácido	2,3
Clímax	Rabbiteye	Originária da Geórgia, tamanho médio, azul escuro, bastante pruína na superfície	3
Powderblue	Rabbiteye	Originária de Maryland, tamanho pequeno a médio, azul claro, bastante pruína na superfície	1,3
Woodard	Rabbiteye	Originária da Geórgia, azul claro, polpa macia	3
Tifblue	Rabbiteye	Originária da Geórgia, tamanho pequeno, azul claro, polpa firme, maturação tardia	1,2
Beckyblue	Rabbiteye	Polpa firme, requerimento 300-400 h de frio, azul médio	5

Tabela 1. Cultivares, grupos e características de mirtilos testados na América do Sul
(continuação)

Brightwell	Rabbiteye	Tamanho de médio a grande, polpa firme	4
Bonita	Rabbiteye	Originária da Flórida, tamanho de médio a grande, azul claro, sabor adstringente	3
Windy	Rabbiteye	Originária da Flórida, tamanho de médio a grande, polpa firme	3

1 – Strik, Finn & Moore, 2014; 2 - Brooks & Olmo, 1997; 3 - Raseira & Antunes, 2004; 4 - Krewer & NeSmith, 2006; 5 - Galleta & Ballington, 1996

As principais cultivares plantadas na América Latina são: ‘bluecrop’, uma das mais cultivadas no Chile, apresentando excelente qualidade, tamanho grande e coloração azul clara; “Duke” e “Brigitta” com uma exigência de frio superior a 700 horas; “Coville” com porte vigoroso e produtivo e fruto grande, resistente ao rompimento e de bom sabor agridoce; “Elliot” que é a cultivar mais exigente em frio cultivada no Brasil e tem como característica a sua produção tardia, sendo colhida de janeiro a abril, “Bluecrispy” que apresenta uma rara firmeza, e uma textura quase crocante da fruta madura, as frutas desta cultivar são muito doces, têm boa conservação e resistem muito bem ao transporte apresentando qualidade tipo exportação mesmo quando o clima se torna quente e chuvoso (Krewer & Nesmith, 2006; Nesmith, 2008). “O’neal” predomina nos cultivos na Argentina, no Uruguai e no Chile, tendo o início da colheita nas condições da Argentina e Uruguai no mês de outubro, o que proporciona excelentes preços para exportação. No Brasil, necessita de controle antigeada, devido à precocidade da sua primeira floração, que ocorre entre julho e agosto (Brooks & Olmo, 1997) e “Misty” está sendo muito plantada no Uruguai e na Argentina (Raseira & Antunes, 2004).

O grupo chamado “Rabbiteye” (olho de coelho) é originário do sul da América do Norte, pertence a espécie *Vaccinium ashei* Reade, possui uma alta produção por planta (vigor elevado) e seus frutos têm uma maior conservação pós-colheita, porém o tamanho da fruta é inferior ao das cultivares do grupo “Highbush”. Uma de suas

características importantes é a tolerância a deficiência hídrica e baixa necessidade de horas de frio (300 a 650 h) o que faz com que esta espécie apresente importância comercial em regiões com menor disponibilidade de frio, se adaptando bem as condições do sul e sudeste do país. Das cultivares produzidas na América do Sul, Tifblue por muitos anos, foi a cultivar de mirtilo do tipo “Rabbiteye”, mais plantada no mundo (Brooks & Olmo, 1997).

O mirtilo “Lowbush” em sua maioria pertence a espécie *Vaccinium angustifolium*, embora segundo Raseira e Antunes (2004) o mirtilo do Canadá (*Vaccinium myrtilloides* e *Vaccinium boreale*) também pertença a este grupo, que tem em comum uma alta exigência em horas de frio (necessitando um frio hibernal de até 1100 h), o que faz com que este grupo não seja produzido no Brasil. Este grupo tem hábito de crescimento rasteiro e produz frutos de pequeno tamanho, cujo destino é a indústria processadora (Hoffmann, 2002).

Existe uma outra espécie de mirtilo, *Vaccinium myrtillos* L., nativa do norte de Europa e também encontrada em algumas partes da América do norte e Ásia, denominada “Bilberry”. Esta fruta possui uma cor azul intensa e polpa pigmentada diferente da polpa do mirtilo americano (“blueberry”) que não possui antocianinas. Este tipo de mirtilo tem encontrado aplicações como fármacos e suplementos dietéticos. A droga comercial Difrel®, contém 100 mg de antocianinas de mirtilo acrescido de 5 mg de β -caroteno e é prescrita para doenças do aparelho circulatório (Camire, 2002).

3 Composição Química

De acordo com Moraes et al. (2007), o mirtilo apresenta em média cerca de 15% de carboidratos (**Tabela 2**). Os principais açúcares encontrados nas frutas são sacarose, glicose e frutose, encontrando-se no mirtilo nas concentrações de 0,12-1,14%,

3,28-3,87% e 3,34-3,88%, respectivamente. Sendo que a elevada quantidade de frutose, geralmente o açúcar majoritário no mirtilo, torna a fruta interessante para ser consumida por diabéticos (Talcott, 2007; Nile & Park, 2014). Wang et al. (2008) suportam esta afirmação dizendo que os principais açúcares encontrados no mirtilo, são frutose e glicose, já a sacarose encontra-se em menores quantidades, provavelmente devido a alta atividade da invertase, durante o estágio final de maturação (Milivojevic et al., 2013). A concentração destes açúcares é importante para a qualidade da fruta pois a frutose é 1,8 vezes mais doce que a sacarose e a glicose apresenta 60% da doçura da frutose. Sendo interessante ressaltar que, a forma de cultivo da fruta exerce influência sobre a concentração de açúcares, pois mirtilos plantados no sistema de cultivo orgânico apresentam maiores quantidades de açúcares (frutose e glicose) que os plantados no cultivo convencional (Wang et al, 2008).

Tabela 2. Composição centesimal de algumas cultivares de mirtilo Rabbiteye em comparação com o grupo Highbush

	Delite	Bluebelle	Woodard	Florida	Highbush*
Umidade	81,3	83,0	82,5	82,3	84,2
Lipídeos	0,26	0,25	0,28	0,25	0,33
Proteínas	1,8	1,7	1,6	1,4	0,74
Cinzas	0,2	0,2	0,2	0,2	0,24
Carboidratos	16,4	14,9	15,4	15,9	14,5

Fonte: Moraes, et al. 2007 * Talcott, 2007

Dos polissacarídeos encontrados nas frutas maduras destaca-se principalmente a celulose, hemicelulose, pectina e lignina, as quais são encontradas principalmente na parede celular, além de contribuírem para o valor nutritivo, os açúcares também são responsáveis pela textura e sabor das frutas juntamente com os ácidos orgânicos (Kader & Barrett, 2005; Palka, 2007).

O conteúdo de açúcares no mirtilo é compensado pela presença de ácidos orgânicos e também ácidos fenólicos, que podem conferir sabor amargo ou adstringente. A complementação dos ácidos orgânicos com os ácidos fenólicos é responsável pela acidez titulável que é comumente medida como um índice global de qualidade das frutas (Talcott, 2007). Segundo Pertuzatti (2009) a acidez titulável de algumas cultivares de grupo Rabbiteye variou de 0,05-0,1% de ácido málico, nas frutas colhidas na safra de 2007/2008.

Os ácidos orgânicos também ajudam a estabilizar o ácido ascórbico e são fundamentais na cor do fruto, servindo para estabilizar as antocianinas e estender a vida útil de produtos frescos e frutos processados (Talcott, 2007). Os ácidos orgânicos encontrados no mirtilo são ácido cítrico e ácido málico. Talcott (2007) relata apenas a presença de ácido málico na fruta, com uma variação do teor de 0,06 a 1,10% e Milivojevic et al (2013) encontraram os dois ácidos orgânicos, mas neste trabalho o ácido orgânico majoritário na fruta foi ácido cítrico 0,1 – 0,23 % enquanto o ácido málico apresentava quantidades de 0,05 – 0,12%.

Compostos voláteis são normalmente ésteres, álcoois, ácidos, aldeídos e cetonas (Kader & Barrett, 2005). No caso dos mirtilos, Simon et al. (1999) demonstraram que os níveis de emissão de compostos orgânicos voláteis são muito baixos comparados com outras frutas como morango, e apenas o butil-acetato poderia ser observado. No entanto, de acordo com Su & Chien (2010) o aroma de mirtilo é composto de linalol, 2-*trans*-hexenol, 2-*trans*-hexenal, 3-*cis*-hexenol, 3-*cis*-hexenal. Terpenos, aldeídos C6 insaturados e álcoois insaturados tem sido reportados como compostos predominantes identificados em extratos voláteis de mirtilo “Rabbiteye”. Du, Olmstead & Rouseff (2012), caracterizaram o perfil de voláteis em quatro cultivares de mirtilos Southern Highbush, “Snowchaser”, “Primadonna”, “Jewel” e “Kestrel”,

encontrando 14 picos, dos quais 11 foram identificados, sendo (*E*)-2-hexenal o composto majoritário.

A maioria das proteínas presentes em frutas desempenham funções enzimáticas e são encontradas principalmente nas camadas citoplasmáticas da célula. O teor de proteína dos frutos varia de menos de 1% a mais de 1,5% (Palka, 2007) e o teor encontrado por Moraes et al. (2007) em cultivares de mirtilo do grupo Rabbiteye na safra de 2005/2006 está apresentado na **Tabela 2**. As enzimas, que catalisam processos metabólicos nas frutas, são proteínas importantes nas reações envolvidas no amadurecimento e senescência dos frutos (Kader & Barret, 2005). Em mirtilos, polifenoloxidase e peroxidase são as enzimas relatadas por aumentar o amadurecimento do fruto e a deterioração da sua qualidade (Talcott 2007). No entanto, Kader et al. (1997b) constataram que a peroxidase não desempenha um papel na degradação do ácido clorogênico, principal ácido hidroxicinâmico do mirtilo, apenas a polifenoloxidase está envolvida e esta apresenta uma atividade ótima a um pH 4,0 (Kader et al., 1997a; Robards et al., 1999) o qual é próximo ao pH do mirtilo 2,6-3,6 (Moraes et al., 2007; Pertuzatti, 2009).

Lipídeos constituem menos de 1% na maioria das frutas frescas. Entretanto, os lipídeos são muito importantes porque constituem a membrana celular, formam a superfície da cera (pruína) que contribui para a coloração azul do mirtilo e estão presentes também na cutícula que protege os frutos contra patógenos e perda de água (Kader & Barret, 2005).

Mirtilos contêm uma gama variada de nutrientes com reconhecidas atividades biológicas que promovem ou contribuem para a saúde, dentre eles as vitaminas (**Tabela 3**). Das vitaminas hidrossolúveis presentes no mirtilo incluem-se a vitamina C, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, vitamina B6 e folatos, enquanto que das

vitaminas lipossolúveis encontra-se a vitamina A, vitamina K e tocoferóis (Talcott, 2007). Essas vitaminas, ajudam a impulsionar o sistema imune, reduzir a inflamação e atuam como antioxidantes (Nile & Park, 2014).

Segundo Pertuzatti et al. (2012) o conteúdo de tocoferóis e tocotrienóis em plantas é maior em folhas e outros tecidos mais expostos a luz solar, como a casca das frutas, e menor em raízes e tecidos expostos a pouca luz. No entanto, os teores de γ -tocoferol encontrados nas cascas de mirtilos analisadas (0,5 – 1,7 mg de γ -tocoferol.100g⁻¹ casca) podem ser comparados com fontes ricas em tocoferóis, como o azeite de oliva, que segundo Lampi et al. (2002), apresenta teores de 1,3 – 5 mg de γ -tocoferol.100g⁻¹azeite ou óleo de girassol 0,4 – 3,0 mg de γ -tocoferol.100g⁻¹; no entanto, o mesmo autor constata que o total de tocoferóis nestes óleos pode chegar a 203 mg de tocoferóis.100g⁻¹ amostra no azeite de oliva e 91 mg de tocoferóis.100g⁻¹ amostra no óleo de girassol.

Vitaminas lipossolúveis como os tocoferóis são menos sensíveis a perdas pós-colheitas que as vitaminas hidrossolúveis como o ácido ascórbico (Kader & Barret, 2005). A estabilidade do ácido ascórbico é conhecida por ser influenciada por inúmeros fatores, incluindo temperatura, exposição à luz, atmosfera, frutos danificados, processamento de alimentos e ácido ascórbico oxidase (Talcott, 2007), mas comparativamente com outras pequenas frutas o mirtilo apresenta pequenas quantidades de vitamina C (Barcia et al., 2010).

Tabela 3. Conteúdo de vitaminas no mirtilo

Vitaminas	Conteúdo (por 100 g)
Ácido ascórbico (mg)	9,7
Tiamina (mg)	0,04
Riboflavina (mg)	0,04
Niacina (mg)	0,42
Ácido pantotênico (mg)	0,12
Vitamina B6 (mg)	0,05
Folatos (µg)	6
Vitamina A (IU)	54
α- tocoferol (mg)	0,57
β- tocoferol (mg)	0,01
γ- tocoferol (mg)	0,36
Δ- tocoferol (mg)	0,03
Vitamina K (µg)	19,3

Fonte: Talcott, 2007

Mirtilos contém os seguintes minerais: cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês, fósforo, potássio, selênio, sódio e zinco (Ebadi, 2007). Potássio é o mineral mais abundante nas frutas e o encontrado em maior quantidade no mirtilo (77 mg), normalmente em combinação com ácidos orgânicos (Nile & Park, 2014). Altos conteúdos são normalmente associados com aumento na acidez e melhoria na cor das frutas. Fósforo é o segundo mineral em maior quantidade no mirtilo (12 mg), aparecendo como um constituinte das proteínas citoplasmáticas e nucleares e desempenhando um papel importante no metabolismo dos carboidratos e transferência de energia. Cálcio e magnésio encontram-se na mesma quantidade nesta fruta (6 mg). Sendo o cálcio um constituinte mineral associado principalmente com a parede celular e o mágnesio um componente das moléculas de clorofila (Kader & Barrett, 2005; Talcott, 2007).

4 Compostos fenólicos

As pequenas frutas são fontes ricas em polifenóis, especialmente flavonoides (**Figura 1**) (Howard & Hager, 2007). O mirtilo é particularmente rico em antocianinas, flavonóis e ácido clorogênico (Moze et al., 2011). Skrede et al. (2000) encontraram 27 mg de ácido clorogênico, 40 mg de flavonóis glicosídeos e 10 mg de procianidinas, todos por 100g de mirtilo “highbush” fresco. No entanto, diferentes cultivares apresentam diferenças significativas no teor total de compostos fenólicos (Moyer et al, 2002) e também na composição individual dos mesmos (Pertuzatti et al., 2012). O grau de maturação da fruta é outro fator significativo nas diferenças encontradas no teor de compostos fenólicos da fruta, Prior et al. (1998) constataram que os fenólicos totais aumentaram com o aumento da maturação respectivamente, 169 e 113% nas cultivares Brightwell e Tifblue, pertencentes ao grupo Rabbiteye. No entanto o conteúdo de flavonóis e ácidos hidroxicinâmicos diminui a medida que o fruto amadurece (Castrejón, et al., 2008).

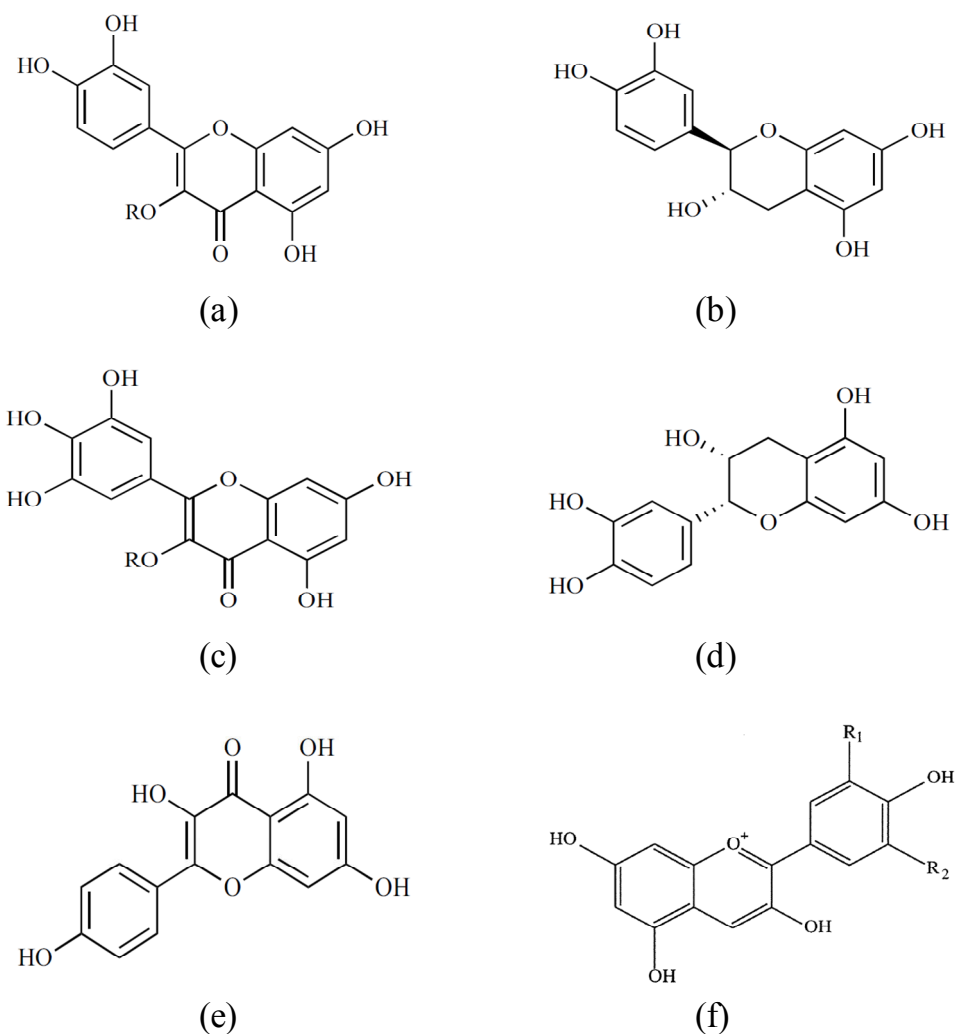


Figura 1 Estrutura de alguns dos principais flavonoides encontrados no mirtilo. (a) quercetina, (b) catequina, (c) miricetina, (d) epicatequina, (e) kaempferol, (f) antocianidina; R1 e R2 na figura (f) podem ser H, OH ou OCH3 dependendo da antocianidina.

Como pode ser visualizado na **Tabela 4**, os níveis de compostos fenólicos totais em mirtilos Highbush, Lowbush, Rabbiteye e Southern Highbush em diversos estudos variam de 118 a 461 mg/100 g de fruta fresca, 299 a 374 mg/100 g de fruta fresca, 175 a 592 mg/100 g de fruta fresca, e 116 a 586 mg/100 g de fruta fresca, respectivamente. Segundo Prior et al. (1998), o conteúdo médio de fenólicos totais no mirtilo, em base seca, é aproximadamente 2500 mg/100g sendo um dos mais altos entre frutas e hortaliças.

Tabela 4. Conteúdo (mg/100g fruta fresca) de compostos fenólicos e antocianinas em mirtilo

Espécie e cultivar	TPH ^a	ACY ^b	Referência
Rabbiteye cv. Powderblue	816,9-876,5	108,1-128	1,2
Rabbiteye cv. Delite	750,5-791,4	72- 109,5	1,2
Rabbiteye cv. Woodard	816,8	109,0	1
Rabbiteye cv. Brightwell	271,4-457,5	61,8-161,7	3
Rabbiteye cv. Bluebelle	858,5	70,2	2
Rabbiteye cv. Tifblue	361,1-409,3	87,4-154,2	3
Rabbiteye cv. Briteblue	814,2	117,6	2
Rabbiteye cv. Clímax	230,8-612,6	90,8-217,5	2,3
Rabbiteye cv. Bluegem	717	242	4
Bilberry	525,0	299,6	3
Highbush cv. Bluecrop (N)	118-461	74-123	3,4,5,6,7
Highbush cv. Brigitta Blue (N)	246	103	4
Highbush cv. Duke (N)	274-305,9	127,4-278	3,4,5
Highbush cv. Rubel (N)	390,5-435	235,4-269	3,4
Highbush cv. Northsky (S)	175-471	89-164	5,6
Highbush cv. Northcountry (S)	175-592	131-220	5,6
Highbush cv. Summit (S)	211	73	4
Highbush cv. O'neal (S)	227,3	92,6	3
Lowbush	299-374	91-255	3,8

TPH= fenólicos totais; ACY=antocianinas totais; (N)= Northern Highbush; (S)= Southern Highbush; ^a = expresso em ácido gálico; ^b = expresso em cianidina-3-glicosídeo; 1 - Jacques et al., 2009; 2 - Pertuzatti et al., 2012; 3 - Prior et al., 1998; 4 - Moyer et al., 2002; 5 - Connor et al., 2002; 6 - Taruscio et al., 2004; 7 - Milivojevic et al., 2013; 8 - Kalt et al., 2001.

Polifenóis de mirtilo são susceptíveis a perdas durante o processamento e armazenamento. Perdas significantes de antocianinas e procianidinas foram observadas durante o processamento de sucos (Skrede et al, 2000; Moraes et al., 2007; Brownmiller et al., 2009; Howard et al., 2012), purês (Brownmiller et al., 2009) e geleias de mirtilo (Howard et al., 2010). Moraes et al. (2007) observaram que as perdas ocorridas durante o processamento de sucos geralmente são mais severas que em outros métodos de preservação, devido a remoção das sementes e da casca da fruta. Já o processamento de geleias resulta em perdas significativas de ácido clorogênico, segundo Howard et al. (2010) geleias de mirtilo com e sem adição de açúcar tiveram uma perda de 15 e 20% de ácido clorogênico, respectivamente.

4.1 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos predominantes nas pequenas frutas são os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos (**Figura 2** e **Tabela 5**), dos compostos fenólicos analisados por Castrejón et al. (2008) os ácidos hidroxicinâmicos foram o principal grupo encontrado em mirtilos em todos os estádios de maturação. Esta classe de compostos é encontrada em todas as partes das plantas de mirtilo, incluindo mirtilo europeu (“Bilberry”) (Riihinen et al., 2008).

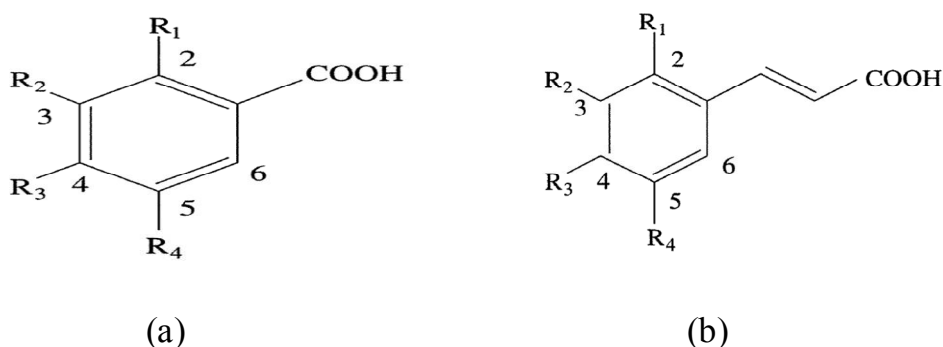


Figura 2 Estrutura dos ácidos fenólicos. (a) ácido hidroxibenzóico, (b) ácido hidroxicinâmico; 2,3,4,5 e 6 encontram-se na **Tabela 5**.

Tabela 5. Padrão de substituição dos ácidos fenólicos

Composto	Número das substituições encontradas na estrutura da Figura 2				
	2	3	4	5	6
Ácidos Hidroxibenzóicos					
ácido salicílico	OH	H	H	H	H
ácido <i>m</i> -hidroxibenzóico	H	OH	H	H	H
ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	H	H	OH	H	H
ácido protocatecuico	H	OH	OH	H	H
ácido gálico	H	OH	OH	OH	H
ácido vanílico	H	OCH ₃	OH	H	H
ácido siringico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
Ácidos hidrocinnâmicos					
ácido <i>p</i> -cumárico	H	H	OH	H	H
ácido cafeico	H	OH	OH	H	H
ácido ferúlico	H	OCH ₃	OH	H	H
Ácido sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H

Fonte: Beer et al., 2002

Estes ácidos raramente ocorrem como ácidos livres, eles são comumente encontrados na forma conjugada como ésteres e glicosídeos. Em mirtilos, os ácidos hidroxibenzóicos: gentísico, gálico, protocatecuico, salicílico, siríngico e vanílico, estão presentes na forma livre, éster e glicosídeo, com a forma éster e glicosídeo do ácido sacílico predominante. Os ácidos hidroxicinâmicos, cafeico, *m*-cumárico, *o*-cumárico, *p*-cumárico e ferúlico, também estão presentes na forma livre, éster e glicosídeo com ácido sinápico e 3-4-dimetoxicinâmico presentes na forma éster e glicosídeo e ácido dihidroxicinâmico na forma éster (Kader et al., 1996; Howard & Hager, 2007). Na **Tabela 6**, podem ser visualizados os ácidos fenólicos que já foram encontrados em mirtilos.

Tabela 6. Total de ácidos fenólicos no mirtilo (mg/kg)

Ácidos fenólicos	Conteúdo	Referência
Gentísico	28,6	1
Gálico	17,6	1
Elágico	14,0-44,0	2
<i>p</i> -hidroxibenzóico	<1,0	3
<i>o</i> -pirocatecuico	0,26	1
Protocatecuico	21,4	1
Salicílico	91,8	1
Siríngico	7,82	1
Vanílico	21,0	1
Veratrico	1,43	1
Clorogênico	227-1580	3,4
Cafeico	1,0-223,0	1,3,4,5
<i>m</i> -cumárico	89,1	1
<i>o</i> -cumárico	40,0	1
<i>p</i> -cumárico	2,0-143,2	1,4,5
3,4-dimetoxicinâmico	136,3	1
Ferulico	2,0-53,5	3,4
2-Hidroxicafeico	136,1	1
<i>p</i> -hidroxifenil acético	3,08	1

1 - Zadernowski et al., 2005; 2 - Shen et al., 2014 ; 3 - Taruscio, Barney & Exon, 2004 ; 4 - Yousef et al., 2013 ; 5 - Hakkinen e Torronen, 2000.

O ácido clorogênico é o ácido hidroxicinâmico predominante em mirtilos (Wang et al., 2012; Rodriguez-Mateos et al., 2012), seu conteúdo nos grupos “highbush”, “lowbush” e “southern highbush” varia de 22,7 mg/100g de fruta fresca até

1,58 g/kg de fruta fresca (Taruscio, Barney & Exon, 2004; Yousef et al., 2013), podendo representar até 96,5% dos ácidos fenólicos presentes no mirtilo (Yousef et al., 2013). No entanto, por ser um dos compostos fenólicos menos estáveis (Aaby, Grimmer & Holtung, 2013), alguns trabalhos relatam que em resíduos provenientes da elaboração de sucos existe uma grande degradação deste composto (Bener et al., 2013).

Além do ácido clorogênico, derivados específicos do ácido hidroxibenzóico e hidroxicinâmicos identificados no mirtilo incluem o ácido neoclorogênico, ácido 5-*p*-cumaroilquínicos, ácido 5-feruolquínico, ácido malonil-cafeoilquínico e os ácidos β -D-glicosídeos de caféico, *p*-cumárico, ferúlico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico e gálico (Belitz & Grosch, 1997; Howard & Hager, 2007; Gavrilova et al., 2011).

De acordo com Zadernowski et al. (2005) o ácido *p*-cumárico é o ácido hidroxicinâmico predominante na forma éster, excluindo o ácido clorogênico que não foi determinado no estudo por ser instável a condições alcalinas, se degradando rapidamente em ácido cafeico, enquanto os ácidos 3,4-dimetoxicinâmico e 2-hidroxicafeico são os glicosídeos predominantes. Ácidos fenólicos encontram-se principalmente nas formas glicosídeos e ésteres, 56,7% e 40,7%, respectivamente, enquanto que os ácidos livres representam 2,6% no fruto.

4.2 Flavonóis

Os flavonóis mais comumente encontrados em mirtilo são, quercetina, miricetina e kaempferol, geralmente estes compostos estão presentes nas frutas na forma de glicosídeos, com um açúcar ligado na posição C3. Glicose e galactose são os açúcares mais comumente ligados, mas rutinose, xilose, arabinose e ramnose também são encontradas (Howard & Hager, 2007). De acordo com Howard e Hager (2007) catorze derivados de quercetina, incluindo compostos acilados com ácido cafeico e

acético, já foram encontrados no mirtilo, juntamente com quatro derivados de miricetina e dois de kaempferol.

Mirtilo contém níveis mais elevados de flavonóis que morangos e framboesas, seu teor de quercetina varia entre 1,7 e 4,7 mg/ 100g de fruta fresca enquanto a miricetina apresenta uma variação entre 0,8 e 1,8 mg/ 100g de fruta fresca (Howard & Hager, 2007). Os derivados de quercetina são os flavonóis dominantes em mirtilo, destes a quercetina 3-galactosídeo apresenta-se como majoritária no fruto, mas alguns genótipos contém quantidades apreciáveis de quercetina 3-ramnosídeo (Cho et al., 2004; Gavrilova et al., 2011). Segundo Johnson e Arjmandi, (2013), estudos examinaram o potencial de misturas de suco de mirtilo e maçã, ricas em quercetina, em proteger contra a indução de danos oxidativos ao DNA em humanos, em um destes estudos (Wilms et al., 2007) os voluntários consumiam um litro de suco por dia (97 mg de quercetina), durante quatro semanas e os resultados demonstraram um aumento na concentração de quercetina no plasma e 20% de redução dos danos oxidativos ao DNA induzidos por H_2O_2 *ex vivo*.

Os flavonóis quercetina e miricetina são encontrados principalmente na casca da fruta (Riihinen et al., 2008; Pertuzatti et al., 2012). As folhas de mirtilos europeus e americanos são constituídas principalmente de quercetina e kaempferol em quantidades tão elevadas que fazem com que principalmente as folhas do mirtilo europeu sejam uma ótima fonte para a extração de flavonóis para utilização em cosméticos (Riihinen et al., 2008). A presença dos flavonóis principalmente nas cascas e folhas dos frutos se deve ao fato da radiação solar aumentar a sua produção, o que sugere que estes compostos sejam fotoprotetores (Jaakola et al., 2004). Na **Tabela 7**, estão apresentados os flavonóis que já foram identificados em mirtilo.

Tabela 7. Composição de flavonóis em mirtilo

Flavonol	Referências					
	1	2	3	4	5	6
Miricetina-3-arabinosídeo		✓	✓			
Miricetina-3-galactosídeo	✓				✓	
Miricetina-3-glicosídeo	✓					
Miricetina 3-ramnosídeo	✓					
Quercetina-3-galactosídeo	✓	✓	✓	✓	✓	
Quercetina-3-glicosídeo	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Quercetina-diglicosídeo					✓	
Quercetina-3-rutinosídeo	✓				✓	
Quercetina-3-ramnosídeo				✓		
Quercetina-3-arabinosídeo					✓	✓
Quercetina-3-acetilglicosídeo					✓	
Quercetina-3-acetilramnosídeo	✓					
Kaempferol-3- glucoronídeo			✓			
Kaempferol-3-glicosídeo			✓	✓	✓	
Rutina						✓
Laricitrina-3-glicosídeo						✓
Siringetina-3-glicosídeo						✓

1 - Cho et al., 2004; 2 - Wang et al., 2008; 3 - Wang et al., 2009; 4 - Kader et al., 1996;
5 - Borges et al., 2010; 6 - Gavrilova et al., 2011.

De acordo com Kader et al. (1996), muitas vezes o kaempferol não é encontrado no mirtilo, no entanto diferenças nas variedades (Howard e Hager, 2007; Pertuzatti, 2009), no estágio de maturação, e em fatores climáticos e agrônômicos, como nutrientes do solo, são responsáveis por mudanças na composição de flavonóis nas frutas.

4.3 Elagitaninos

Ao contrário da framboesa, morango e amora, mirtilos não contêm elagitaninos nem outros derivados do ácido elágico. Os níveis de ácido elágico total no mirtilo após a hidrólise ácida são de menos de 5 mg/100g de fruta fresca (Howard & Hager, 2007).

4.4 Proantocianidinas

Proantocianidinas, também chamadas de taninos condensados, estão presentes em uma ampla variedade de alimentos e podem ser divididas em duas principais classes que incluem as procianidinas, misturas de oligômeros e polímeros compostas por unidades de (+)-catequinas e/ou (-)-epicatequinas e as propelargonidinas, compostas exclusivamente por unidades de epiafzelequina (Appeldoorn et al., 2009). No entanto, mirtilos possuem exclusivamente procianidinas, que são consideradas um dos principais compostos fenólicos presentes na polpa da fruta (Howard & Hager, 2007; Riihinen et al., 2008). Esses compostos, são classificados de acordo com o seu grau de polimerização (DP), DP = 1 indica um monômero, enquanto DP = 2-10 e DP > 10 referem-se a oligômeros e polímeros, respectivamente (Gu et al., 2002).

As unidades monoméricas das procianidinas estão ligadas através de uma ligação C4-C8 ou C4-C6 (tipo B) e podem coexistir com uma ligação C2-O-C7 ou, menos frequentemente, C2-O-C5 (tipo A) (Appeldoorn et al., 2009). Destas, Hwang et al. (2014) encontraram 300 mg de procianidina B1/100g fruta fresca em extratos de mirtilo, conteúdo este considerado bastante inferior ao encontrado para a aronia (*Aronia melanocarpa*), outra fruta analisada no trabalho (2,5 g/100g fruta fresca) e conhecida por sua elevada adstringência.

Os níveis de procianidinas em mirtilos de variedades do grupo Highbush e Lowbush, muitas vezes são considerados similares, podendo variar entre 33-180 mg/100 de fruta fresca para o grupo Highbush e 57-332 mg/100 de fruta fresca no grupo

Lowbush (Howard & Hager, 2007; Rodriguez-Mateos et al., 2012). Dímeros de flavonóis representam os flavonóis majoritários presentes no mirtilo, aproximadamente 24% dos flavonóis, enquanto hexâmeros, monômeros e heptâmeros apresentam um porcentagem média de 12,6, 11,2 e 11% respectivamente (Rodriguez-Mateos et al., 2012). As procianidinas poliméricas de mirtilos Lowbush foram caracterizadas por Gu et al (2002), e estes autores relatam que seu grau de polimerização varia de 20-114, com epicatequina representando 100% das unidades de extensão e catequina e epicatequina representando 67% e 33% das unidades terminais, respectivamente.

Segundo Eskin e Snait (2006) um número das frações de proantocianidinas foram recentemente separadas a partir de extratos de mirtilo. Destas, apenas os oligômeros de proantocianidinas de elevada massa molecular exibiram propriedades antiproliferativas e antiadesão. Por exemplo, duas frações compostas predominantemente de quatro a oito oligômeros de proantocianidinas ligados com grau médio de polimerização de 3,25 e 5,65 preveniram adesão do organismo responsável por infecções urinárias, *Escherichia coli*. Entretanto somente a fração deste último apresentou atividade antiproliferativa contra o câncer de próstata humana e em células cancerosas do fígado de ratos.

4.5 Antocianinas

Antocianinas são o subgrupo dos flavonoides, mais amplamente distribuído na natureza, sendo especialmente abundantes em pequenas frutas, vermelhas, roxas e azuis, dentre elas o mirtilo, onde são os principais compostos fenólicos encontrados (**Figura 3 e Tabela 8**) (Nile & Park, 2014). Esses pigmentos estão presentes tanto na casca quanto na polpa do mirtilo europeu e apenas na casca dos demais tipos de mirtilo, devido a isto o conteúdo de antocianinas no mirtilo europeu é superior aos demais, o que faz com que ele seja considerado uma das melhores fontes de antocianinas (Riihinen et al., 2008).

Perfis cromatográficos tem mostrado que as antocianinas correspondem de 35 – 74% dos compostos fenólicos no mirtilo (Gavrilova et al., 2011). Ao se comparar diferentes tipos de mirtilo, estudos indicam que mirtilos do grupo Rabbiteye apresentam maiores quantidades de antocianinas que mirtilos Highbush, Southern Highbush e Lowbush (Howard & Hager, 2007)

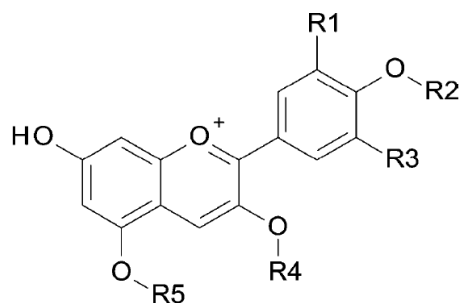


Figura 3. Estrutura química das antocianinas e antocianidinas. Os radicais encontram-se na **Tabela 8**, com suas identificações.

Tabela 8. Grupamentos ligados aos radicais para formação de antocianinas e antocianidinas

Composto	Radicais encontrados na estrutura da Figura 3				
	R1	R2	R3	R4	R5
Antocianinas					
pelargonidina-3,5-di- <i>O</i> -glicosídeo	H	H	H	glicosídeo	glicose
pelargonidina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	H	H	H	rutinosídeo	H
delfinidina -3- <i>O</i> -glicosídeo	OH	H	OH	glicosídeo	H
delfinidina -3- <i>O</i> -rutinosídeo	OH	H	OH	rutinosídeo	H
delfinidina -3,5-di- <i>O</i> -glicosídeo	OH	H	OH	glicosídeo	glicose
delfinidina -3- <i>O</i> -sambubiosídeo	OH	H	OH	sambubiose	H
delfinidina-3- <i>O</i> -ramnosídeo	OH	H	OH	ramnosídeo	H
malvidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	OCH ₃	H	OCH ₃	glicosídeo	H
malvidina-3,5-di- <i>O</i> -glicosídeo	OCH ₃	H	OCH ₃	glicosídeo	glicose
malvidina-3- <i>O</i> -galactosídeo	OCH ₃	H	OCH ₃	galactosídeo	H
cianidina -3- <i>O</i> -glicosídeo	OH	H	H	glicosídeo	H
cianidina -3- <i>O</i> -rutinosídeo	OH	H	H	rutinosídeo	H
cianidina -3,5-di- <i>O</i> -glicosídeo	OH	H	H	glicosídeo	glicose
cianidina -3- <i>O</i> -soforosídeo	OH	H	H	soforosídeo	H
cianidina -3- <i>O</i> -arabinosídeo	OH	H	H	arabinosídeo	H
cianidina -3- <i>O</i> -ramnosídeo	OH	H	H	ramnosídeo	H
cianidina -3- <i>O</i> -galactosídeo	OH	H	H	galactosídeo	H
cianidina -3- <i>O</i> -sambubiosídeo	OH	H	H	sambubiose	H
cianidina -3- <i>O</i> -latirosídeo	OH	H	H	latirosídeo	H
Antocianidinas					
Pelargonidina	H	H	H	H	H
Cianidina	OH	H	H	H	H
Delfinidina	OH	H	OH	H	H
Petunidina	OCH ₃	H	OH	H	H
Malvidina	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H
Peonidina	OCH ₃	H	H	H	H

Fonte: Srovnalova et al., 2014

De acordo com a **Tabela 4** o total de antocianinas em mirtilos Highbush, Lowbush, Rabbiteye e Southern highbush varia entre 74 a 278 mg/100 g de fruta fresca, 91 a 255 mg/100 g de fruta fresca, 62 a 242 mg/100 g de fruta fresca, e 73 a 220 mg/100 g de fruta fresca, respectivamente. Outro fator relacionado com a quantidade de antocianinas no fruto é o tamanho do mesmo, muitos estudos verificaram que quanto menor é o mirtilo maior é a quantidade de antocianinas que ele apresenta (Gao & Mazza, 1994; Moyer et al., 2002).

Antocianidinas são muito instáveis e raramente são encontradas em sua forma livre dentro dos tecidos das plantas (Giusti & Jing, 2007; Howard & Hager, 2007). Antocianidinas ocorrem principalmente na forma glicosilada (antocianinas), pois a substituição do açúcar aumenta a sua estabilidade e solubilidade (Giusti & Jing, 2007). Devido a diversidade de monoglicosídeos e a acilação com ácidos alifáticos como o ácido acético e malônico, muitas antocianinas já foram identificadas nos diferentes grupos de mirtilo (**Tabela 9**). Em extratos de mirtilo Highbush, 15 antocianinas não-aciladas e 5 antocianinas aciladas foram identificadas (Ma et al., 2013; Yousef et al., 2013), já em mirtilo Rabbiteye nenhuma antocianina acilada foi encontrada e 14 antocianinas não-aciladas foram identificadas (Sun et al., 2012). Com relação a cultivares de mirtilo do grupo Lowbush, 25 antocianinas individuais (11 aciladas) foram reportadas (Gao & Mazza, 1994).

Tabela 9. Composição de antocianinas em mirtilo

Antocianinas	(continua)							
	Referências							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Delfinidina 3-galactosídeo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Delfinidina 3-glicosídeo	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
Delfinidina 3-arabinosídeo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Cianidina 3-galactosídeo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Cianidina 3-glicosídeo	✓	✓	✓	✓				✓
Cianidina 3-arabinosídeo	✓	✓		✓			✓	✓
Petunidina 3-galactosídeo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Petunidina 3-glicosídeo	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Petunidina 3-arabinosídeo	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Peonidina 3-galactosídeo	✓	✓	✓	✓			✓	✓
Peonidina 3-glicosídeo								✓
Peonidina 3-arabinosídeo	✓	✓					✓	✓

Tabela 9. Composição de antocianinas em mirtilo

	(continuação)							
Malvidina 3-galactosídeo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Malvidina 3-glicosídeo	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
Malvidina 3-arabinosídeo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Delfinidina 3-(acetil)galactosídeo		✓	✓					
Delfinidina 3-(6''-acetil)glicosídeo	✓	✓	✓				✓	
Delfinidina 3-(malonil)glicosídeo				✓				
Cianidina 3-(6''-acetil)galactosídeo		✓		✓				
Cianidina 3-(6''-acetil)glicosídeo		✓		✓				
Cianidina 3-(acetil)arabinosídeo		✓						
Cianidina 3-(malonil)glicosídeo				✓				
Petunidina 3-(acetil)galactosídeo		✓						
Petunidina 3-(6''-acetil)glicosídeo	✓	✓		✓			✓	
Petunidina + pentose				✓				
Peonidina 3-(6''-acetil)galactosídeo		✓		✓				
Peonidina 3-(6''-acetil)glicosídeo		✓		✓				
Malvidina 3-(6''-acetil)galactosídeo		✓	✓	✓				
Malvidina 3-(6''-acetil)glicosídeo	✓	✓	✓	✓			✓	
Malvidina 3-(malonil)glicosídeo				✓				
Malvidina + acetil + hexose				✓				

1 - Cho et al., 2004; 2 - Gao e Mazza, 1994; 3 - Skrede et al., 2000; 4 - Wu et al., 2006; 5 - Wang et al., 2008; 6 - Wang et al., 2009; 7 - Borges et al., 2010; 8 - Ma et al., 2013

De acordo com Cho et al., (2004) a porcentagem de distribuição de antocianinas monoméricas em cinco genótipos de mirtilo pertencentes aos grupos Highbush, Southern Highbush e Rabbiteye foi delfinidina (27% a 40%), malvidina (22% a 33%), petunidina (19% a 26%), cianidina (6% a 14%) e peonidina (1% a 5%), com relação a porcentagem de distribuição de antocianinas glicosiladas, predominam galactosídeos no mirtilo, 60 a 67%, seguidos por arabinosídeos (26 a 32%) e glicosídeos (2 a 29%).

Em diversos estudos realizados, as antocianinas tem demonstrado possíveis benefícios a saúde humana, por apresentar atividade anti-inflamatória (Krikorian et al., 2010), anticarcinogênica (Seeram et al., 2006; Giusti & Jing, 2007) e antimutagênica, a qual é capaz de bloquear o metabolismo celular do câncer ou matar as células cancerígenas (Smith et al., 2004; Nile & Park, 2014). Outro benefício associado ao consumo de antocianinas, está relacionado com efeito antidiabetes. Roopchand et al. (2013) observaram que ratos alimentados por doze semanas com farinha de soja enriquecida com antocianinas extraídas de suco de mirtilo, ao receberem uma dieta correspondente a 4,4 mg de antocianinas por dia, diminuíram os níveis de glicose no sangue, reduziram o colesterol e apresentaram redução no ganho de peso, demonstrando efeitos positivos em uma dieta para diabéticos.

Extratos de antocianinas obtidos de três cultivares de mirtilo Rabbiteye (Briteblue, Tifblue, Powderblue) apresentam elevados efeitos antiproliferativos em dois tipos de linhagens celulares de carcinoma colorretal humano (HT-29 e Caco-2), quando comparados com outros três extratos fenólicos (ácidos fenólicos, taninos e flavonóis) obtidos das mesmas frutas (Yi et al., 2005). Já extratos de mirtilo europeu são mais eficientes na inibição do crescimento de linhagens celulares de leucemia promielocítica aguda (HL60) e linhagens celulares de carcinoma colorretal humano (HCT116) (Katsube et al., 2003).

O consumo de mirtilo europeu também tem sido associado, há muitos anos, com benefícios aos olhos por melhorar a visão noturna e no tratamento de glaucoma e retinopatia, já que as antocianinas deste fruto são responsáveis por regenerar os pigmentos da retina, aumentar a circulação dentro dos capilares da retina e proteger os olhos da luz ultravioleta (Camire, 2002). Segundo Giusti e Jing (2007) extratos antociânicos de mirtilo tem sido comercializados como suplementos dietéticos. Na

Europa, extratos de mirtilo (bilberry), tem sido receitados para a visão, especialmente visão noturna, este benefício também é a principal razão para a popularidade do produto no Japão e Coréia, onde é usado para aliviar a fadiga ocular induzida pelo uso excessivo de computadores (Camire, 2002).

Outra utilização das antocianinas de mirtilo europeu como suplemento está relacionada com benefícios para a circulação, enquanto suplementos dos demais grupos de mirtilo são utilizados para manter o trato urinário saudável e melhorar as funções cerebrais (Giusti & Jing, 2007). Krikorian et al. (2010) investigaram a relação entre a suplementação com mirtilo e as melhorias na memória de idosos com idade média de 76 anos, e constataram que o consumo diário de suco de mirtilo pode conferir benefícios neurocognitivos, pois as antocianinas estão associadas com o aumento da sinalização neuronal dos centros cerebrais.

5 Carotenoides

Carotenoides é uma classe de pigmentos presentes em mirtilo. De acordo com Jacques et al. (2009) e Pertuzatti et al. (2012), suas concentrações variam de 0,3 a 10,8 µg/g de fruta fresca, sendo encontrados em maior quantidade na casca do que na polpa da fruta. Já em mirtilos europeus o conteúdo de carotenoides pode chegar a 37 µg/g de fruta fresca (Heinonen et al., 1989). Embora estas concentrações sejam baixas quando comparadas com outras frutas ricas em carotenoides, a sua presença indica a diversidade de fitoquímicos presentes nesta fruta além de contribuir como um precursor do aroma, ao serem convertidos em norisoprenoides, compostos identificados como responsáveis pelo aroma das uvas (Talcott, 2007; Jimenez-Garcia et al., 2013).

Na literatura dados sobre o conteúdo de carotenoides em berries são limitados. Heinonen et al. (1989) encontraram luteína+zeaxantina, β-criptoxantina, α-caroteno e β-caroteno no mirtilo e Marinova e Ribarova (2007) encontraram luteína, zeaxantina, β-

criptoxantina e β -caroteno, e constataram que não havia presença de α -caroteno porque durante o amadurecimento da fruta ocorre a hidroxilação deste carotenoide e então ele é convertido em luteína, o qual juntamente com β -criptoxantina e β -caroteno são os carotenoides majoritários no mirtilo (Marinova e Ribarova, 2007; Bunea et al., 2012; Pertuzatti et al., 2012). Com relação ao mirtilo europeu, seis carotenoides foram encontrados, sendo eles, neoxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina e β -caroteno (Lashmanova, Kuzivanova & Dymova, 2012).

6 Capacidade antioxidante

Devido ao elevado conteúdo de fitoquímicos presentes no mirtilo, muitos estudos sobre a capacidade antioxidante destes compostos começaram a ser realizados, Prior et al. (1998) realizaram um dos primeiros estudos sobre capacidade antioxidante desta fruta, neste trabalho os autores utilizaram mirtilos Rabbiteye, Highbush, Southern Highbush e Lowbush de diferentes regiões dos Estados Unidos além de mirtilo Europeu (Bilberry), para verificar o quanto compostos fenólicos, conteúdo de antocianinas, conteúdo de vitamina C, grau de maturidade e variedade de espécies influenciavam na capacidade antioxidante desta fruta, e dentre suas constatações observaram que o mirtilo, quando comparado com outras frutas, era a fruta fresca com mais alta capacidade antioxidante (quando utilizado o método de ORAC). No entanto, também observaram que existe muita variação na capacidade antioxidante devido a diferença entre espécies de mirtilo (13,9 a 45,9 μmol de equivalente trolox/g de fruta fresca) isso ocorre principalmente devido as variações no teor de antocianinas e demais compostos fenólicos na fruta.

Prior et al. (1998) também reportaram que os valores de ORAC aumentaram com o aumento do grau de maturação dos frutos e que isto ocorria porque existe uma

correlação linear entre a capacidade antioxidante e conteúdo de antocianinas ($r_{xy}=0,77$) ou fenólicos totais ($r_{xy}=0,92$) e a medida que o fruto amadurecia, seu teor de compostos fenólicos totais e conteúdo de antocianinas aumentava.

No entanto, a capacidade antioxidante dos frutos também varia de acordo com o método analítico utilizado para a determinação. Garcia-Alonso et al. (2004) ao avaliarem a capacidade antioxidante de vinte e oito frutas da Espanha observaram que o mirtilo obteve a quinta maior capacidade antioxidante (morango > framboesa > cereja > amora > mirtilo) quando utilizado o método que determina a inibição da peroxidação lipídica (TBARS do inglês, substâncias reativas ao ácido tiobartitúrico) e a mesma fruta obteve a terceira maior capacidade antioxidante, valores inferiores apenas ao caqui e a amora, quando utilizado o método de varredura do cátion radical 2,2'-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonate) ($ABTS^{+}$) que segundo Rice-Evans et al., (1995) tem como os principais compostos fenólicos responsáveis no extrato aquoso: quercetina > cianidina > catequina.

Quando utilizado o método que avalia o poder de redução do ferro (FRAP), Borges et al., (2010) constataram que o mirtilo obteve a segunda maior capacidade antioxidante (cassis > mirtilo > framboesa > groselha > “cranberry”), que variou de 18,5 a 161,4 μmol de Fe^{2+} /g de fruta fresca (Moyer et al., 2002; Taruscio et al., 2004), esta grande amplitude de resultados ocorre devido a um variado número de fatores, como cultivar, grau de maturação, época e condições de armazenamento (Borges et al., 2010).

Tabela 10. Capacidade antioxidante de compostos fenólicos e vitamina C em mirtilos

Composto	Quantidade (nmol/g)	CA (nmol de Trolox/g)
Vitamina C	115 ± 4	Nd
Delfinidina 3-galactosídeo	729 ± 64	1135 ± 44
Delfinidina 3-glicosídeo	67 ± 1	61 ± 2
Cianidina 3-galactosídeo + Delfinidina 3-arabinosídeo	590 ± 5	860 ± 39
Cianidina 3-arabinosídeo	119 ± 4	142 ± 4
Petunidina 3-galactosídeo	402 ± 35	680 ± 41
Petunidina 3-arabinosídeo Peonidina 3-galactosídeo	282 ± 19	421 ± 42
Peonidina 3-arabinosídeo	96 ± 5	25 ± 1
Malvidina 3-galactosídeo	996 ± 100	654 ± 96
Malvidina 3-glicosídeo + Delfinidina 3-(6''-acetil)glicosídeo	212 ± 8	90 ± 19
Malvidina 3-arabinosídeo	888 ± 77	510 ± 33
Petunidina 3-(6''-acetil)glicosídeo	81 ± 6	164 ± 4
Malvidina 3-(6''-acetil)glicosídeo	348 ± 15	83 ± 2
Miricetina 3-galactosídeo	114 ± 11	-
Quercetina diglicosídeo + ácido 5-feruloilquinico	16 ± 3	239 ± 1
Quercetina 3-rutinosídeo	31 ± 1	18 ± 2
Quercetina 3-galactosídeo	368 ± 36	303 ± 17
Quercetina 3-glicosídeo	155 ± 15	144 ± 6
Quercetina 3-arabnosídeo + Quercetina 3-(6''acetil)glicosídeo	75 ± 2,3	45 ± 2

CA= capacidade antioxidante

Fonte: Borges et al., 2010

Na **Tabela 10** está apresentada uma análise de capacidade antioxidante “on line” detectada por HPLC, realizada por Borges et al. (2010), neste trabalho os autores constataram que o baixo nível de vitamina C na fruta, não contribui para a sua capacidade antioxidante, a qual é devido principalmente a alta quantidade de antocianina presente na fruta, responsáveis por 84% da capacidade antioxidante do mirtilo. Dentre as antocianinas presentes no mirtilo Borges et al. (2010) verificaram que as principais responsáveis pela capacidade antioxidante são delfinidina 3-galactosídeo (20,4% ± 0,8), cianidina 3-galactosídeo+ delfinidina 3-arabinosídeo (15,4% ± 0,7), petunidina 3-galactosídeo (12,2% ± 0,7) e malvidina 3-galactosídeo (11,7% ± 1,7).

Em outro estudo as propriedades antioxidantes de antocianinas de mirtilo foram analisadas *in vitro* e *in vivo* utilizando células vermelhas do sangue (CVS) resistentes a espécies reativas de oxigênio (ERO) como modelo. A incubação *in vitro* com antocianinas e ácidos hidroxicinâmicos (0,5 e 0,05 mg/mL) aumentou significativamente a resistência das CVS e a produção induzida de ERO'S. Um efeito protetor similar também foi observado *in vivo* através da suplementação oral de ratos com 100 mg/ml. Apenas o grupo alimentado com antocianinas teve uma proteção significativa em 6 e 24h pós suplementação, mas isto não foi consistente com as medições de níveis plasmáticos de antocianinas. De fato, as concentrações plasmáticas foram maiores após 1h, diminuindo consideravelmente após 6h e não sendo detectadas após 24h. A diferença na absorção entre antocianinas e ácidos hidroxicinâmicos provavelmente contribuiu para as diferenças observadas na capacidade de proteção das CVS. Essa proteção representa um papel positivo após o consumo de mirtilo contra a formação de ERO's nas células vermelhas do sangue *in vivo* (Youdim et al., 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaby, K., Grimmer, S. & Holtung, L. (2013). Extraction of phenolic compounds from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) press residue: Effects on phenolic composition and cell proliferation. *LWT-Food Science and Technology*, 54, 257-264.
- Antunes, L. E. C. & Raseira, M. C. B. (2006). *Cultivo do mirtilo (Vaccinium spp.)*. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 99.
- Antunes, L. E. C., Raseira, M. C. B. & Pereira, J. F. M. (2007). Situação atual da oferta e demanda de mirtilo no Brasil. In: Curso produção de mirtilo de baixo requerimento de frio. *Palestras...* Pelotas: Embrapa Clima Temperado.
- Apeeldoorn, M. M., Sanders, M., Vincken, J., Cheynier, V., Le Guernevé, C., Hollman, P. C. H. & Gruppen, H. (2009). Efficient isolation of major procyanidin A-type dimers from peanut skins and B-type dimers from grape seeds. *Food Chemistry*, 117, 713-720.
- Bañados, M. P. (2006). Blueberry production in South America. *Acta Horticulturae*, 715, 165-172.
- Barcia, M. T., Jacques, A. C., Pertuzatti, P. B. & Zambiasi, R. C. (2010). Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(2), 381-390.
- Belitz, H. & Grosch, W. (1997). *Química de los Alimentos*. Zaragoza: Ed. Acribia, Espanha.
- Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W. C. A. & Manley, M. (2002). Phenolic compounds: A review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 23(2), 48-61.

- Bener, M., Shen, Y., Apak, R., Finley, J. W. & Xu, Z. (2013). Release and Degradation of Anthocyanins and Phenolics from Blueberry Pomace during Thermal Acid Hydrolysis and Dry Heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6643-6649.
- Brooks & Olmo (1997). Register of fruit and nut varieties., 3.ed. Alexandria: ASHS, 743.
- Brownmiller, C., Howard, L. R. & Prior, R. L. (2009). Processing and Storage Effects on Procyanidin Composition and Concentration of Processed Blueberry Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1896–1902.
- Bunea, A., Rugina, D., Pinte, A., Andrei, S., Bunea, C., Pop, R. & Bele, C. (2012). Carotenoid and fatty acid profiles of bilberries and cultivated blueberries from Romania. *Chemical Papers*, 66 (10), 935-939.
- Camire, M. E. (2002). Phytochemicals in the *Vaccinium* Family: Bilberries, Blueberries, and Cranberries. In: Meskin, M. S, Bidlack, W. R., Davies, A. J. & Omaye, S. T. Phytochemicals in nutrition and health. Crc press.
- Castrejón, A. D. R., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L. W. & Huyskens-Keil, S. (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109, 564–572.
- Cho, M. J., Howard, L. R., Prior, R. L. & Clark, J. R. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Science Food and Agricultural*, 84, 1771–1782.

- Connor, A. M., Luby, J. J., Tong, C. B. S., Finn, C. E. & Hancock, J. F. (2002). Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 127(1), 89-97.
- Demchak, K., Harper, J. K. & Kime, L. (2014). Highbush blueberry production. *Agricultural Alternatives*. Penn State Cooperative Extension. Disponível em: <<http://pubs.cas.psu.edu/freepubs/pdfs/ua265.pdf>>. Acesso em: 29 mar.2014, 14:00.
- Du, X., Olmstead, J. & Rouseff, R. (2012). Comparison of Fast Gas Chromatography–Surface Acoustic Wave (FGC-SAW) Detection and GC-MS for Characterizing Blueberry Cultivars and Maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5099-5106.
- Ebadi, M. (2007). PharmAcodynamic Basis of herbal medicine. CRC PRESS, 2nd Ed.
- Eskin, N. A. M. & Snait, T. (2006). *Dictionary of nutraceuticals and functional foods.*, CRC Press, USA.
- Fachinello, J. C. (2008) Mirtilo. Revista Brasileira de Fruticultura. 30 (2),285 – 576.
- FAOSTAT (2012) – *Agriculture Data*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/> >. Acesso em: 23 fev. 2014, 14:25.
- Galletta, G. J. & Ballington, J. R. (1996). Blueberry, cranberries, and lingonberries In: Janick, J.; Moore, J.N. Fruit Breeding. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 1-108.

- Gao, L. & Mazza, G. (1994). Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics in blueberries. *Journal of Food Science*, 59, 1057–1059.
- García-Alonso, M., Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C. & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry*, 84, 13–18.
- Gavrilova, V., Kajdzanoska, M., Gjamovski, V. & Stefova, M. (2011). Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLA-DAD-ESI-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4009-4018.
- Giusti, M. M. & Jing, P. Natural pigments of berries: Functionality and application. In: Zhao, Y. *Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion*; CRC PRESS, 2007.
- Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Cunningham, D., Vannozzi, S. & Prior, R. L. (2002). Fractionation of Polymeric Procyanidins from Lowbush Blueberry and Quantification of Procyanidins in Selected Foods with an Optimized Normal-Phase HPLC-MS Fluorescent Detection Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4852-4860.
- Hakkinen, S. H. & Torronen, A. R. (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 33, 517-524.

- Heinonen, M. I., Ollilainen, V., Linkola, E. K., Varo, P. T. & Koivistoinen, P. E. (1989). Carotenoids in Finnish Foods: Vegetables, Fruits, and Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 655-659.
- Hoffmann, A. (2002). Mirtilo: Aspectos gerais da cultura. Artigo técnicos Embrapa Uva e vinho. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/mirtilo.html>>. Acesso em: 29 mar. 2014, 15:00.
- Howard, L. R. & Hager, T. J. (2007). Berry fruit phytochemicals. In: Zhao, Y. Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion; CRC PRESS.
- Howard, L. R., Castrodale, C., Brownmiller, C. & Mauromoustakos, A. (2010). Jam Processing and Storage Effects on Blueberry Polyphenolics and Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4022-4029.
- Howard, L. R., Prior, R. L., Liyanage, R. & Lay, J. O. (2012). Processing and Storage Effect on Berry Polyphenols: Challenges and Implications for Bioactive Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6678-6693.
- Hwang, S. J., Yoon, W. B., Lee, O., Cha, S. J. & Kim, J. D. (2014). Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chemistry*, 146, 71-77.
- Jaakola, L., Maatta-Riihinen, K., Karenlampi, S. & Hohtola, A. (2004). Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*, 218, 721-728.
- Jacques, A. C., Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T. & Zambiasi, R. C. (2009). Nota científica: compostos bioativos em pequenas frutas cultivadas na região sul do

- Estado do Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Food Technology*. 12(2), 123-127.
- Jimenez-Garcia, S. N., Guevara-Gonzalez, R. G., Miranda-Lopez, R., Feregrino-Perez, A. A., Torres-Pacheco, I. & Vazquez-Cruz, M. A. (2013). Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics. *Food Research International*. 54, 1195-1207.
- Johnson, S. A. & Arjmandi, B. H. (2013). Evidence for anti-cancer properties of blueberries: A mini-review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13, 1142-1148.
- Kader, A. A. & Barrett, D. M. (2005). Classification, Composition of Fruits, and Postharvest Maintenance of Quality. In: Barrett, D. M., Somogyi, L. & Ramaswamy, H.(2005). Processing fruits: Science and Technology. CRC PRESS, 2 Ed.
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M. & Metche, M. (1996). Fractionation and identification of the phenolic compounds of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.), *Food Chemistry*, 55(1), 35–40.
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M. & Metche, M. (1997). Mechanism of Browning in Fresh Highbush Blueberry Fruit (*Vaccinium corymbosum* L). Partial purification and Characterisation of Blueberry Polyphenol Oxidase. *Journal of Science Food and Agricultural*, 73, 513-516 a.
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M. & Metche, M. (1997). Mechanism of Browning in Fresh Highbush Blueberry Fruit (*Vaccinium corymbosum* L). Role of Blueberry

- Polyphenol Oxidase, Chlorogenic Acid and Anthocyanins. *Journal of Science Food and Agricultural*, 74, 31-34 b.
- Kalt, W., Ryan, D. A. J., Duy, J. C., Prior, R. L., Ehlenfeldt, M. K. & Vander Kloet, S. P. (2001). Interspecific Variation in Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity among Genotypes of Highbush and Lowbush Blueberries (*Vaccinium* Section *cyanococcus* spp.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4761-4767.
- Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K. & Kobori, M. (2003). Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 68-75
- Krewer, G. & Nesmith, D. S. (2006). *Blueberry cultivars for Georgia*. Disponível em: <http://www.smallfruits.org/Blueberries/production/06bbcvproc_Nov0206.pdf>.
- Acesso em: 29 mar. 2014, 15:05.
- Krikorian, R., Shidler, M. D., Nash, T. A., Kalt, W., Vinqvist-Tymchuk, M. R., Shukitt-Hale, B. & Joseph, J. A. (2010). Blueberry Supplementation Improves Memory in Older Adults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3996–4000.
- Lampi, A-M., Kamal-Eldin, A. & Piironen, V. (2002). Tocopherols and tocotrienols from oil and cereal grains. In: *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*. v.2, CRC Press., 2-29.
- Lashmanova, K. A., Kuzivanova, O. A. & Dymova, O. V. (2012). Northern Berries as a source of carotenoids. *Acta Biochimica Polonica*, 59 (1), 133-134.
- Ma, C., Dastmalchi, K., Flores, G., Wu, S., Pedraza-Peñalosa, P., Long, C. & Kennelly, E. L. (2013). Antioxidant and Metabolite Profiling of North American and

- Neotropical Blueberries Using LC-TOF-MS and Multivariate Analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3548-3559.
- Madail, J. C. M. & Santos A. M. (2004). Aspectos Econômicos. In: Raseira, M., C., B. & Antunes, L., E., C. (2004). A Cultura do Mirtilo. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, documento 121, 29-36. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/744895>>. Acesso em: 08 mar. 2014, 13:48.
- Marinova, D. & Ribarova, F. (2007). HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 370–374.
- Milivojevic, J., Rakonjac, V., Fotiric-Aksic, M., Pristov, J. B. & Maksimovic, V. (2013). Classification and fingerprinting of different berries based on biochemical profiling and antioxidant capacity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(9), 1285-1294.
- Moraes, J. O., Pertuzatti, P. B., Corrêa, F. V. & Salas-Mellado, M. D. L. M. (2007). Estudo do mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) no processamento de produtos alimentícios. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 18-22.
- Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B. & Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519-525.
- Moze, S., Polak, T., Gasperlin, L., Koron, D., Vanzo, A., Ulrih, N. P. & Abram, V. (2011). Phenolics in Slovenian Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and

- Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6998-7004.
- NeSmith, D. S. (2008). A summary of current and past blueberry cultivars grown in Georgia. In: Simpósio Nacional do Morango, 4.; Encontro Sobre Pequenas Frutas Nativas do Mercosul, 3., 2008, Pelotas. *Palestras e resumos...* Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 53-64.
- Nile, S. H. & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30, 134-144.
- Palka, K. (2007). Chemical Composition and Structure of Foods. In: Sikorski, Z. E. Chemical and Functional Properties of Food Components; CRCPRESS, 3 Ed.
- Pertuzatti, P. B. (2009). Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). 68p. Dissertação. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.
- Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Jacques, A. C., Vizzotto, M., Godoy, H. T. & Zambiazzi, R. C. (2012). Quantification of several bioactive compounds and antioxidant activities of six cultivars of Brazilian blueberry. *The Natural Products Journal*. 2, 188-195.
- Prior, R. L. (1998). Antioxidant capacity and health benefits of fruits and vegetables: blueberries, the leader of the Pack. Proc 32nd Ann. Open House North Carolina Blueberry Council 32, 3-12.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., Mcewen, J., O'brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G. & Mainland, C. M. (1998). Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity,

- and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2686-2693.
- Raseira, M., C., B. & Antunes, L., E., C. (2004). A Cultura do Mirtilo. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, documento 121, 29-36. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/744895>>. Acesso em: 08 mar. 2014, 13:48.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M. & Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Rad. Res.*, 22(4), 375–383.
- Riihinen, K., Jaakola, L., KaˆRenlampi, S. & Hohtola, A. (2008). Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and ‘northblue’ blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chemistry*, 110, 156–160.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P. & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.
- Rodriguez-Mateos, A., Cifuentes-Gomez, T., Tabatabaee, S., Lecras, C. & Spencer, J. P. E. (2012). Procyanidin, Anthocyanin, and Chlorogenic Acid Contents of Highbush and Lowbush Blueberries *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5772-5778.
- Roopchand, D. E., Kuhn, P., Rojo, L. E., Lila, M. A. & Raskin, I. (2013). Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice. *Pharmacological Research*, 68, 59-67.

Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S. & Heber, D. (2006). Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells In Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9329-9339.

Sharpe, R. H. (1980). Consultant's Report. Pelotas, IICA/EMBRAPA-UEPAE, 11.

Shen, X., Sun, X., Xie, Q., Liu, H., Zhao, Y., Pan, Y., Hwang, C. & Wu, V. C. H. (2014). Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. *Food Control*, 35, 159-165.

Simon, J. E., Hetzroni, A., Bordelon, B., Miles, G. E. & Charles, D. J. (1999). Electronic sensing of volatiles for quality sorting of blueberries. *J. Food Sci.* 61, 967–969, 1996. In: Boschetti, A. A., Biasioli, F. A., Opbergen, M. A., Warneke, C. B., Jordan, A. B., Holzinger, R. B., Prazeller, P. B., Karl, T. B., Hansel, A. B., Lindinger, W. B. & Ianotta, S. A. (1999). PTR-MS real time monitoring of the emission of volatile organic compounds during postharvest aging of berryfruit. *Postharvest Biology and Technology*, 17, 143–151.

Skrede, G., Wrolstad, R. E. & Durst, R.W. (2000). Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), *Journal of Food Science*, 65, 357.

Smith, S. H., Tate, P. L., Huang, G., Magee, J. B., Meepagala, K. M., Wedge, D. E. & Larcom, L. L. (2004). Antimutagenic activity of berry extracts. *Journal of Medicinal Food*, 7(4), 450-455.

- Sousa, M. B., Curado, T., Vasconcellos, F. N. & Trigo, M. J. (2007). Mirtilo-Qualidade Pós-colheita. Divulgação Agro 556, n 8. Disponível em: <[http://www22.sede.embrapa.br/snt/piue/Produ%E7%E3o%20Integrada%20na%20Uni%E3o%20Europ%E9ia/H\)%20Inst.Ensino%20e%20Pesquisa%20%20PI/H3\)%20Portugal/Pesq.%20e%20Transf.%20de%20Tec.%20Pequenas%20Frutas/8%20Qualidade%20P%F3s%20Colheita%20Mirtilo.pdf](http://www22.sede.embrapa.br/snt/piue/Produ%E7%E3o%20Integrada%20na%20Uni%E3o%20Europ%E9ia/H)%20Inst.Ensino%20e%20Pesquisa%20%20PI/H3)%20Portugal/Pesq.%20e%20Transf.%20de%20Tec.%20Pequenas%20Frutas/8%20Qualidade%20P%F3s%20Colheita%20Mirtilo.pdf)>. Acesso em: 29 mar. 2014, 15:21.
- Srovnalova, A., Svecarova, M., Zapletalova, M. K., Anzenbacher, P., Bachleda, P., Anzenbacherova, E. & Dvorak, Z. (2014). Effects of Anthocyanidins and Anthocyanins on the Expression and Catalytic Activities of CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, and CYP3A4 in Primary Human Hepatocytes and Human Liver Microsomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 789-797.
- Strik, B. C., Finn, C. E. & Moore, P. (2014). Blueberry cultivars for the Pacific Northwest. *A Pacific Northwest Extension Publication*. Disponível em: <<https://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/45871/pnw656.pdf>>. Acesso em: 29 mar. 2014, 16:03.
- Su, M. & Chien, P. (2010). Aroma impact components of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) vinegars. *Food Chemistry*, 119, 923–928.
- Sun, L., Ding, X., Qi, J., Yu, H., He, S., Zhang, J., Ge, H. & Yu, B. (2012). Antioxidant anthocyanins screening through spectrum–effect relationships and DPPH-HPLC-DAD analysis on nine cultivars of introduced rabbiteye blueberry in China. *Food Chemistry*, 132, 759-765.

- Talcott, S. T. (2007). Chemical components of berry fruits. In: Zhao, Y. Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion; CRC PRESS.
- Taruscio, T. G., Barney, D. L. & Exon, J. (2004). Content and Profile of Flavanoid and Phenolic Acid Compounds in Conjunction with the Antioxidant Capacity for a Variety of Northwest *Vaccinium* Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3169-3176.
- USDA-NASS. (2013). Blueberries production. USDA/NASS, Washington, DC. Disponível em: <http://www.nass.usda.gov/Statistics_by_Subject/index.php?sector=CROPS>. Acesso em: 09 mar, 01:01.
- Wang, C. Y., Chen, C. & Wang, S. Y. (2009). Changes of flavonoid content and antioxidant capacity in blueberries after illumination with UV-C. *Food Chemistry*, 117, 426–431.
- Wang, S. Y., Chen, C., Sciarappa, W., Wang, C. Y. & Camp, M. J. (2008). Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5788- 5794.
- Wang, S. Y., Chen, H., Camp, M. J. & Ehlenfeldt, M. K. (2012). Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). *Food Chemistry*, 132, 855-864.
- Wilms, L. C., Boots, A. W., De Boer, V. C., Maas, L. M., Pachen, D. M., Gottschalk, R. W., Ketelslegers, H. B., Godschalk, R. W., Haenen, G. R., van Schooten, F. J. & Kleinjans, J. C. (2007). Impact of multiple genetic polymorphisms on effects of a

- 4-weeks blueberry juice intervention on ex vivo induced lymphocytic DNA damage in human volunteers. *Carcinogenesis*, 28(8), 1800-1806.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E. & Prior, R. L. (2006). Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4069-4075.
- Yi, W., Fischer, J., Krewer, G. & Akoh, C. C. (2005). Phenolic Compounds from Blueberries Can Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation and Induce Apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7320-7329.
- Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B., Mackinnon, S., Kalt, W. & Joseph, J. A. (2000). Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo, *Biochim. Biophys. Acta*, 1523, 117–122. In: Bagchi, M., Zafra-Stone, S., Losso, J. N., Sen, C. K., Roy, S., Hazra, S. & Bagchi, D. Role of Edible Berry Anthocyanins in Angiogenesis. CRC PRESS, 2007.
- Yousef, G. G., Brown, A. F., Funakoshi, Y., Mbeunkui, F., Grace, M. H., Ballington, J. R., Loraine, A. & Lila, M. A. (2013). Efficient Quantification of the Health-Relevant Anthocyanin and Phenolic Acid Profiles in Commercial Cultivars and Breeding Selections of Blueberries (*Vaccinium* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 4806-4815.
- Zadernowski, R., Naczek, M. & Nesterowicz, J. (2005). Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2118-2124.

ARTIGO 1

Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries

Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries

Paula Becker Pertuzatti^{a,b,*}, Milene Teixeira Barcia^a, Daniele Rodrigues^a, Pollyanna Nogueira da Cruz^b, Isidro Hermosín-Gutiérrez^c, Robert Smith^d, Helena Teixeira Godoy^a

^a Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil

^b Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de Mato Grosso, Rodovia BR-070, Km 5, 78600-000 Barra do Garças, MT, Brazil

^c Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Universidad Castilla-La Mancha, Avda. Camilo José Cela S/N, 13071 Ciudad Real, Spain

^d Park University, 8700 NW River Park Drive, Parkville, MO 64152

* Corresponding author: Tel.: +55 66 34057206 ; fax: +55 66 34021110 *Email address:* paulapertuzatti@yahoo.com.br

ABSTRACT

Hydrophilic and lipophilic extracts of ten cultivars of Highbush and Rabbiteye Brazilian blueberries (*Vaccinium corymbosum* L. and *Vaccinium ashei* Reade, respectively) that are used for commercial production were analysed for antioxidant activity by the FRAP, ORAC, ABTS and β -carotene-linoleate methods. Results were correlated to the amounts of carotenoids, total phenolics and anthocyanins. Brazilian blueberries had relatively high concentration of total phenolics (1622–3457 mg gallic acid equivalents per 100 g DW) and total anthocyanins (140–318 mg cyanidin-3-glucoside equivalents per 100 g DW), as well as being a good source of carotenoids. There was a higher positive correlation between the amounts of these compounds and the antioxidant activity of hydrophilic compared to lipophilic extracts. There were also significant differences in the level of bioactive compounds and antioxidant activities between different cultivars, production location and year of cultivation.

Keywords: Phenolics, Anthocyanins, Carotenoids, Blueberry, Principal Component Analysis

1 INTRODUCTION

Blueberries are one of the most widely consumed fruits in the world, so many studies have been done on their properties. The work Prior et al. (1998) is of special interest. They reported that blueberries had the highest antioxidant activity of any of the 42 fruits and vegetables that they evaluated. However, most of the research has focused on the phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins, which are the major pigments in blueberries (Moyer, Hummer, Finn, Frei & Wrolstad, 2002; Wang, Chen, Camp & Ehlenfeldt, 2012). Moreover, blueberries are widely cultivated in North America, but can only be harvested during the summer. In contrast, they are not yet as widely cultivated in Brazil, even though they can potentially be grown in all seasons (Pertuzatti et al., 2012). Moreover, some tropical blueberries have higher antioxidant contents than cultivars that are grown in temperate climates (Dastmalchi, Flores, Petrova, Pedraza-Peñalosa & Kennedy, 2011). So, there is special interest in being able to grow and export Brazilian blueberries, especially from October through May, which is between the harvest season in the USA, Canada and Europe, where the demand is huge.

Pertuzatti et al. (2012) found small amounts of carotenoids and ascorbic acid, along with elevated levels of tocopherols in the fruits, which was also reported by others (Barcia, Jacques, Pertuzatti, & Zambiasi, 2010). So, compounds other than phenolics can affect the antioxidant activity of blueberries. Due to this, the objective of this study was to analyse hydrophilic and lipophilic extracts of ten blueberry Brazilian cultivars used in commercial production for antioxidant activity by four different methods.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals and Reagents

The chemicals, 2,2'-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS, 99%), β -carotene, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ, 99%), gallic acid (97.5-102.5%), ($\pm$)-6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox®, 97%), 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) and fluorescein disodium were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), linoleic acid was obtained from Fluka (Deisenhofen, Germany).

2.2 Sample

Seventeen samples (**Table 1.1**) from 10 blueberry cultivars in two harvests, 2010/2011 and 2011/2012 were cut in half, frozen and lyophilized in a Terroni Freeze-dryer, model LS-3000E, São Paulo, Brazil. Liquid nitrogen was added to them, and they were crushed. Then they were placed in aluminum bags, evacuated and stored at -20°C until analysed.

Table 1.1 Cultivars, species and producers of Brazilian blueberries, with their respective cities.

Cultivar	Specie	Producer	Cities
Elliot	Highbush	1	Campestre da Serra (28° 47' S, 51° 05' W)
Florida	Rabbiteye	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Bluecrop	Highbush	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Elliot	Highbush	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Climax	Rabbiteye	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Powderblue	Rabbiteye	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Bluegem	Rabbiteye	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Coville	Highbush	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Powderblue	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)
Briteblue	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)
Woodard	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)
Florida	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)
Climax	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)
Bluegem	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)
Elliot	Highbush	4	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Darrow	Highbush	4	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Bluecrop	Highbush	4	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)

2.3 Preparation of extracts

The lipophilic extract was prepared by a slight modification of the method described by Rodriguez-Amaya (2001). That is, 15 mL of acetone + 7 g of lyophilized sample was sonicated for 10 mins in an Ultrasound SX-20 (Arruda, Ultra-Sons LTDA, Brazil) and filtered. This was repeated three times and the filtrates combined. This was partitioned between petroleum ether and water. The petroleum ether phase was taken as the lipophilic fraction and analysed immediately, to prevent any decomposition of the analytes. The hydrophilic extract was prepared by the method of Bochi et al. (2014), adding extraction solution consisting of 50 mL of 0.35:20:80 formic acid/acetone/water (v/v/v) to 250 mg of lyophilized product, followed by stirring for 20 mins. The mixture was filtered and the filtrate collected and another 50 mL extraction solution was added, followed by filtration. The filtrates were combined.

A UV-Vis 1600 spectrophotometer from Shanghai Mapada Instruments was used to measure UV-Vis absorbances.

2.4 Determination of Total Phenolics (TPH)

The concentrations of phenolic compounds were determined by the method of Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventos (1999). That is, aliquots of the hydrophilic extract were added to 2.5 mL of a solution of the Folin-Ciocalteu reagent (diluted 1:10 in water). After 5 mins, 2.0 mL of 7.5% Na₂CO₃ were added. After 2 hrs the absorbance at 760 nm was read. A calibration curve was constructed using gallic acid and results were expressed as mg of gallic acid equivalents per 100 g of sample (mg GAE/100 g).

2.5 Determination of Total Anthocyanins (ACY)

Anthocyanins in the hydrophilic extracts were quantified by the pH differential method of Giusti & Wrolstad (2001) by measuring absorbances at 520 and 700 nm. The molar extinction coefficient and molecular weight of cyanidin-3-glucoside (CYD-3-G)

were used ($26900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and 449.2 g/mol), so results were expressed as mg CYD-3-G per 100 g dry weight (mg CYD-3-G/100 g DW).

2.6 Determination of Total Carotenoids

Total carotenoids in lipophilic extracts were determined by the method of Rodriguez-Amaya (2001) by measuring the absorbance at 450 nm. The results were expressed as μg of carotenoids per g of dry weight ($\mu\text{g } \beta\text{-carotene/g DW}$), using the molar extinction coefficient of $\beta\text{-carotene}$ in petroleum ether ($2592 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.7 Determination of the antioxidant activity

2.7.1 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

The reduction of ferric tripyridyltriazine ($\text{Fe}^{+3}\text{-TPTZ}$) was measured by the method of Benzie & Strain (1996), in which the absorbance at 593 nm was measured. Results were expressed as Trolox equivalents per gram of dry weight, TE/g DW.

2.7.2 Free radical capture ABTS

This was done as described by Re et al. (1999). A stock solution of 7 mM ABTS in 2.45 mM potassium sulphate was stored refrigerated and in the dark. Prior to doing the analyses, this was diluted in ethanol until the absorbance at 734 nm was 0.70 ± 0.02 . For the analysis of the lipophilic extract, this was dried under a stream of nitrogen gas, and then re-suspended in isopropanol/acetonitrile 1:1 (v/v). Next, 30 μL of the hydrophilic or lipophilic extract of the sample was added to a test tube, along with 3 mL of dilute ABTS solution. After being incubated for 25 mins at 30°C , the absorbance was read and compared to that of Trolox. Results were expressed as Trolox equivalents per g of dry weight, or TE/g DW.

2.7.3 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

The method of Dávalos, Gómez-Cordovéz & Bartolomé (2004) was used to measure the ORAC values of hydrophilic extracts. That is, 20 μL of the hydrophilic extract was diluted 8-fold with the extraction solution, then placed on microplates,

along with 120 μL of fluorescein (0.387 mg/L) and 60 μL of AAPH (0.108 g/L). The plates were incubated in an automated microplate reader (BMG Labtech) at 37°C and read every min for 80 mins using a fluorescence detector with an excitation wavelength of 485 nm and emission at 520 nm. A calibration curve was prepared using Trolox and the results were expressed as Trolox equivalents per g of dry fruit, or (TE)/g DW.

A modification of the method of Dávalos et al. (2004) was used to determine the ORAC values of lipophilic extracts. The lipophilic extract was dried and then dissolved in 250 μL of acetone and diluted with 750 μL of 7% (v/v) β -methylcyclodextrin (1:1 acetone/water, v/v). This same solution was used as a blank and to dissolve the Trolox standard. Next, 20 μL of the extract was added to microplates, along with 120 μL of fluorescein (0.387 mg/L) and 60 μL of AAPH (0.108 g/L). The fluorescence was read, as described for the lipophilic extracts.

2.7.4 β -carotene/linoleic acid model system

The method of Marco (1968) was used with modifications. First, an emulsion was prepared by adding 300 μL of a solution of β -carotene in chloroform (1 mg/mL), 22 μL of linoleic acid and 200 μL of Tween 40. Next, the chloroform was evaporated off and distilled water was added until the absorbance at 470 nm was between 0.6 and 0.7. Then, 10 μL of extract and 250 μL of the emulsion were placed on the microplate at 45 °C and the absorbance at 470 nm was read every 5 mins for 120 mins. The results were expressed as percentage of inhibition of oxidation.

2.8 Statistical analysis

Data analysis was carried out with ANOVA and Tukey' test focusing on significant differences in means. Correlations among data obtained were calculated using Pearson's correlation coefficient (r). Statistic 7.0 software programme was employed with significance level between mean differences at 5% ($p < 0.05$). Principal

component analysis (PCA) was done using the Pirouette 3.11 program. Data were auto-scaled before doing PCA. All analyses were made in triplicates and the results were given as means.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The results for total phenolics and anthocyanins in hydrophilic extracts are shown in **Table 1.2**. In general, there were significant differences between the different harvests, with the 2010/2011 having more. This can be attributed to the fact that the incidence of UV radiation was higher then, according to the Brazilian National Meteorological Institute, or Instituto Nacional de Meteorologia brasileiro (INMET). From Oct., 2010 to Jan., 2011 it was 3092 KJm² in Vacaria, while from Oct., 2011 to Jan., 2012, the maximum was 3017 KJm² in the city of Erechim. Also, there was less rain during the maturation period during the 2010/2011 harvest than in the 2011/2012 harvest. It is well-known that a lack of water and UV stress causes an elevated production of secondary metabolites such as phenolics and anthocyanins.

According to Agati, Azzarello, Pollastri & Tattini (2012), the biosynthesis of flavonoids increases when plants are grown in bright light or when they are exposed to other types of stress. Excess light on a daily basis is stressful to plants and could reduce the activity of chloroplast antioxidants while up-regulating the biosynthesis of flavonoids, even in the absence of UV irradiance (Agati et al., 2012).

Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries

Table 1.2 Total phenolics and anthocyanins in hidrophilic extracts of blueberries.

Cultivar	Phenolic compounds (mg GAE/100g DW)		Anthocyanins (mg CYD-3-G/100g DW)	
	Harvest 2010/2011	Harvest 2011/2012	Harvest 2010/2011	Harvest 2011/2012
Elliot – 1	2890 ± 206 ab	---	202 ± 16 def	---
Florida – 2	3457 ± 303aA	2550 ± 139 abB	240 ± 17 bcdA	237 ± 17 bcdA
Bluecrop – 2	2311 ± 506 bcdefA	1622 ± 91 eA	261 ± 21 bA	159 ± 13 fgB
Elliot – 2	2285 ± 131 bcdefA	2424 ± 225 abcA	251 ± 17 bcA	298 ± 26 aA
Climax – 2	2541 ± 137 bcdefB	2792 ± 52 aA	186 ± 12 efB	281 ± 10 abcA
Powderblue – 2	2712 ± 184 bcA	2590 ± 301 abA	310 ± 27 aA	222 ± 18 deB
Bluegem – 2	2668 ± 286 bcdA	2540 ± 32 abA	318 ± 22 aA	285 ± 9.6abA
Coville – 2	---	2072 ± 182 cde	---	219 ± 31 de
Powderblue – 3	2555 ± 163 bcdeA	2307 ± 317 bcdA	233 ± 16 bcdA	221 ± 14 deA
Briteblue – 3	2150 ± 39 cdefA	1948 ± 78 deB	159 ± 8.8 fA	142 ± 4.0 fgB
Woodard – 3	2175 ± 108 cdefA	1864 ± 95 deB	163 ± 10 efA	140 ± 3.8 gB
Florida – 3	2489 ± 29 bcdefA	2248 ± 46 bcdB	195 ± 2,8 defA	187 ± 5.7 efA
Climax – 3	2053 ± 205 defA	2182 ± 32 bcdA	173 ± 12 efB	206 ± 4.2 deA
Bluegem – 3	2515 ± 6.3 bcdefA	1931 ± 66 deB	272 ± 5.2 abA	235 ± 16 cdB
Elliot – 4	1949 ± 243 efA	2037 ± 29 cdeA	206 ± 12 cdeA	186 ± 10 efgA
Darrow – 4	1922 ± 88 f	---	157 ± 9.2 f	---
Bluecrop – 4	2008 ± 26 ef	---	172 ± 10 ef	---

Averages followed by the same upper case letters on the same row and lower case letters in different columns do not differ significantly $p \leq 0.05$ by the Tukey test., CYD-3-G = cyanidin-3-glucoside; GAE = gallic acid equivalents; DW = dry weight, Coefficient of variation < 9.0%

The concentration of total phenolics in the hydrophilic extracts ranged from 1922 to 3457 mg gallic acid equivalents (GAEs)/100g DW in the 2010/2011 harvest and 1622–2590 mg GAE/100 g DW in the 2011/2012 harvest. In the first harvest, the Florida cultivar produced in Vacaria and the Elliott cultivar produced in Campestre da Serra had the highest concentrations of phenolic compounds. They did not differ significantly from each other ($p \leq 0.05$). In the second harvest, almost all the cultivars from producer number 2 (city of Vacaria) produced the highest concentrations of phenolic compounds. They did not differ significantly from each other ($p \leq 0.05$), with the exception of Bluecrop and Coville. In general, the cultivars that had the highest concentration of phenolic compounds belonged to the Rabbiteye species (*Vaccinium ashei* Reade), with the exception of the Elliot cultivar, which belonged to the Highbush species (*V. corymbosum* L.). It had the highest concentration of phenolic compounds in both harvests.

The concentration of total anthocyanins in the hydrophilic extracts ranged from 159 to 318 mg CYD-3G/100 g DW in the 2010/2011 harvest and 140-298 mg CYD-3G/100 g DW in the 2011/2012 harvest (**Table 1.2**). These results were lower than those reported by others, who found 72-242 mg CYD-3G/100 g of fresh fruit (Moyer et al. 2002; Jacques, Pertuzatti, Barcia & Zambiasi, 2009), with a water content >80% (Moraes, Pertuzatti, Corrêa & Salas-Mellado, 2007). However, the differences may be attributed to the size of the fruits (Prior et al., 1998), because many studies demonstrated that smaller fruits have a high concentration of anthocyanins, because they are more concentrated in the skin than the pulp (Gao & Mazza, 1994; Moyer et al., 2002) and because it can depend on the climactic conditions (Agati et al., 2012) and type of cultivation (Hakkinen & Torronen, 2000).

Anthocyanins have been shown to have human health benefits in many studies, due to their anti-inflammatory (Krikorian et al., 2010), anticancer (Seeram et al., 2006; Giusti & Jing, 2007) and anti-mutagenic activities which are capable of blocking the metabolism of cancer cells and even kill them (Smith et al., 2004; Nile & Park, 2014).

The antioxidant concentrations found in the hydrophilic extracts are shown in **Table 1.3**. When the ORAC, FRAP and ABTS methods are compared, it can be seen that they are different for the same blueberry cultivar. These are differences in the assays reflect differences in the abilities of antioxidants to quench the peroxyl radical and reduce ABTS⁺ and Fe³⁺ *in vitro* (Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos & Byrne, 2006). Given this, the highest antioxidant capacity was found using the ORAC method, followed by ABTS and FRAP, similar results were reported by others (Rebello et al. 2014). Prior et al. (1998) were the first authors to notice that blueberries have higher antioxidant activity by the ORAC method, confirming that, compared to other fruits and vegetables, blueberries has a relatively high antioxidant activity by this

method. In this way, the large difference found by ORAC, ABTS and FRAP may be indicative of the compounds present in blueberries that act stronger as a scavenger of peroxy radicals than as donors of electrons to the ABTS⁺ radical cation or Fe³⁺.

The ORAC values ranged between 600-1028 µmol TE/g DW for the cultivars analysed in the 2010/2011 harvest and 533-778 µmol TE/g DW for the 2011/2012 harvest. The Powderblue cultivar, produced in Erechim had the highest ORAC value in the 2011/2012 harvest, while the Climax cultivar, produced in Vacaria had the highest ORAC value in the 2010/2011 harvest. Considering that the sample were lyophilized and still retained 4% moisture, the ORAC values can be converted to about 22-41.1 µmol TE/g fresh weight, which can be compared to results reported by others. Moyer et al. (2002) found 18.6–130.7 µmol TE/g fresh weight, Connor et al. (2002) found 10.3–51.9 µmol TE/g fresh weight, and Wang, Chen, Camp & Ehlenfeldt (2012) found 33.8–118.7 µmol TE/g fresh weight. These wide ranges of antioxidant capacities may be due to differences in genotype, climate, sample preparation and analytical techniques. That is, the first two works cited, (Moyer et al., 2002 e Connor et al., 2002) used β-phycoerythrin as the indicator, while Ou, Hampsch-Woodill & Prior (2001) showed that fluorescein is preferable.

Wang et al. (2012) analysed six of the 10 cultivars analysed in the current study and found higher ORAC values. However, two of the cultivars analysed, becky blue (33.8 µmol TE/g DW) and delite (39.2 µmol TE/g DW), had similar values as those reported in this study. The same occurred in the study by Prior et al. (1998), who analysed 23 cultivars from four different species. They found 13.9–37.8 µmol TE/g DW, which was similar to those obtained in the current study. However, the only cultivar that was analysed in both this study and in the one by Prior et al. (1998), was

Climax, which had higher values (19.9-32.8 $\mu\text{mol TE/g DW}$) in the current study than in the one by Prior et al. (1998) ($13.9 \pm 4.1 \mu\text{mol TE/g DW}$).

All the methods for determining antioxidant activity of blueberries produced significant differences between cultivars. In the FRAP assay, the values ranged from 128 to 312 $\mu\text{mol TE/g DW}$ (**Table 1.3**), which represents 5.1–12.5 $\mu\text{mol TE/g}$ fresh weight. The cultivar that had the largest was Florida-2. When comparing this to literature values, it can be seen that the Bluecrop cultivar showed much difference between different studies. In the present study, this cultivar was produced commercially by two vendors from the city of Vacaria (Rio Grande do Sul, Brazil), as shown in **Table 1.1**. Over a two-year period, values ranged from 5.3 to 9.9 $\mu\text{mol TE/g}$ fresh weight, similar to the levels reported by Connor et al. (2002) for the same cultivar (10.6 $\mu\text{mol TE/g FW}$). Taruscio, Barney & Exon (2004) found 20.2 $\mu\text{mol TE/g}$ fresh weight and Moyer et al. (2002) obtained higher values (34.4 $\mu\text{mol TE/g}$ fresh weight). However, the large differences observed in these studies can be attributed to different climatic conditions during cultivation, due to the different regions where the blueberries were planted. That is, Connor et al. (2002) analysed fruits found in northern USA, while Taruscio, Barney & Exon (2004) and Moyer et al. (2002) analysed fruits from northeast USA.

A high positive correlation was found between the FRAP and ABTS values found ($r > 0.8$, $p \leq 0.05$), consistent with the results reported by Thaipong et al. (2006). The range of ABTS values was between 40.3 and 260.8 $\mu\text{mol TE/g DW}$ (**Table 1.3**). These results were similar to those reported by Arancibia-Avila et al. (2012), who analysed Highbush blueberries that were produced in Chile ($197.7 \pm 7.2 \mu\text{mol TE/g DW}$) and Poland ($254.8 \pm 11.9 \mu\text{mol TE/g DW}$). In the present study the Bluegem cultivar (Rabbiteye species) had the highest ABTS value. Also, the four of the cultivars

analysed were in the species *V. Corymbosum* (Elliot, Bluecrop, Coville e Darrow). Their ABTS values ranged from 40.3 $\mu\text{mol TE/g DW}$ (Bluecrop) to 193.9 $\mu\text{mol TE/g DW}$ (Elliot). So, the cultivar Elliot cultivar in this study had about the same antioxidant activity (193.9 $\mu\text{mol TE/g DW}$) as that reported by Arancibia-Avila et al. (2012) for blueberries from Chile (197.7 $\mu\text{mol TE/g DW}$). The lower values found for the Bluecrop cultivar (**Table 1.3**) can be explained by the work of Castrejón, Eichholz, Rohn, Kroh, & Huyskens-Keil (2008), who found that the antioxidant activity of the Bluecrop cultivar decreased during maturation, unlike other cultivars.

Table 1.3 Antioxidant activity of hydrophilic extracts of blueberries, using the ABTS, FRAP, ORAC and β -carotene/linoleate model systems.

Cultivar	FRAP ($\mu\text{mol TE/g DW}$)		Carotene-linoleate (% inhibition)		ABTS ($\mu\text{mol TE/g DW}$)		ORAC ($\mu\text{mol TE/g DW}$)	
	2010/2011 Harvest	2011/2012 Harvest	2010/2011 Harvest	2011/2012 Harvest	2010/2011 Harvest	2011/2012 Harvest	2010/2011 Harvest	2011/2012 Harvest
Elliot –1	273 $\pm$ 20 abc	---	61 $\pm$ 5.8 a	---	112 $\pm$ 8.0 g	---	703 $\pm$ 15 def	---
Florida –2	312 $\pm$ 28 aA	267 $\pm$ 16 abA	38 $\pm$ 3.8 defghiB	46 $\pm$ 3.5 abA	139 $\pm$ 6.6 efB	205 $\pm$ 12 aA	697 $\pm$ 18 defA	549 $\pm$ 21 deB
Bluecrop –2	247 $\pm$ 19 cdeA	178 $\pm$ 15 fB	50 $\pm$ 7.4 abcdefA	52 $\pm$ 7.6 abA	185 $\pm$ 11 cA	118 $\pm$ 5 cB	600 $\pm$ 54 fgA	533 $\pm$ 33 eA
Elliot –2	251 $\pm$ 14 bcdeA	253 $\pm$ 22 abcA	47 $\pm$ 2.4 abcdefgB	57 $\pm$ 5.0 aA	157 $\pm$ 2.5 deB	194 $\pm$ 13 aA	743 $\pm$ 40 cdeA	629 $\pm$ 48 bcdeB
Climax –2	266 $\pm$ 18 abcdA	273 $\pm$ 6.2 aA	46 $\pm$ 0.2 bcdefgA	47 $\pm$ 2.8 abA	172 $\pm$ 11 cdB	217 $\pm$ 5 aA	819 $\pm$ 19 bcdA	778 $\pm$ 21 aA
Powderblue –2	299 $\pm$ 20 abA	253 $\pm$ 17 abcB	30 $\pm$ 3.6 iB	46 $\pm$ 3.0 abA	235 $\pm$ 3.2 bA	214 $\pm$ 5 aB	930 $\pm$ 50 abA	656 $\pm$ 60 bcdB
Bluegem –2	308 $\pm$ 24 aA	262 $\pm$ 6.4 abB	36 $\pm$ 6.3 efghiA	47 $\pm$ 7.2 abA	261 $\pm$ 11 aA	210 $\pm$ 11 aB	646 $\pm$ 15 efA	700 $\pm$ 42 abA
Coville –2	---	215 $\pm$ 20 cdef	---	56 $\pm$ 4.3 a	---	143 $\pm$ 6 bc	---	675 $\pm$ 63 abc
Powderblue –3	172 $\pm$ 12 fghiB	217 $\pm$ 13 cdeA	52 $\pm$ 1.4 abcdA	47 $\pm$ 4.5 abA	73 $\pm$ 2.7 iB	137 $\pm$ 6 bcA	1028 $\pm$ 85 aA	636 $\pm$ 32 bcdeB
Briteblue –3	132 $\pm$ 7.4 hiB	195 $\pm$ 8.0 defA	50 $\pm$ 2.3 abcdeA	52 $\pm$ 5.3 abA	170 $\pm$ 6.7 cdA	140 $\pm$ 7 bcB	763 $\pm$ 69 cdeA	557 $\pm$ 34 cdeA
Woodard –3	140 $\pm$ 13 ghiB	186 $\pm$ 7.4 efA	30 $\pm$ 7.8 hiB	50 $\pm$ 3.4 abA	89 $\pm$ 6.8 hiB	126 $\pm$ 7 cA	851 $\pm$ 69 bcA	549 $\pm$ 47 deB
Florida –3	178 $\pm$ 3 fghB	221 $\pm$ 5.7 cdeA	35 $\pm$ 1.4 ghiB	52 $\pm$ 2.1 abA	105 $\pm$ 5.5 ghB	143 $\pm$ 4 bcA	737 $\pm$ 46 cdeA	657 $\pm$ 48 bcdA
Climax –3	207 $\pm$ 12 efB	232 $\pm$ 5.2 bcdA	35 $\pm$ 7.4 fghiB	53 $\pm$ 1.4 abA	125 $\pm$ 8.5 fgB	164 $\pm$ 12 bA	496 $\pm$ 31 gA	547 $\pm$ 28 deA
Bluegem –3	188 $\pm$ 2 fgB	212 $\pm$ 6.9 defA	45 $\pm$ 1.6 cdefghA	41 $\pm$ 4.0 bA	90 $\pm$ 3.8 hiB	143 $\pm$ 9 bcA	702 $\pm$ 14defA	568 $\pm$ 29 cdeB
Elliot –4	217 $\pm$ 18 defA	203 $\pm$ 11 defA	60 $\pm$ 1.1 abA	57 $\pm$ 5.2 aA	141 $\pm$ 5.5 efA	119 $\pm$ 12 cB	850 $\pm$ 25 bcA	567 $\pm$ 29 cdeB
Darrow –4	128 $\pm$ 8.5 i	---	50 $\pm$ 1.8 abcdef	---	139 $\pm$ 5.1 ef	---	801 $\pm$ 19 bcd	---
Bluecrop –4	132 $\pm$ 4.4 hi	---	57 $\pm$ 9.0 abc	---	40 $\pm$ 3.5 j	---	723 $\pm$ 32 cdef	---

Averages followed by the same upper case letters on the same row and lower case letters in different columns do not differ significantly $p \leq 0.05$ by the Tukey test; TE = Trolox equivalent; DW = dry weight; Coefficient of variation < 10%

Table 1.3 shows the antioxidant capacity of hydrophilic extracts using the β -carotene/linoleic acid model system. The Elliot cultivar (from Campestre da Serra) had the highest antioxidant capacity (60.9% inhibition) using this assay system. The range for all cultivars was 30.4–60.9% inhibition, with Woodard, produced in Erechim having the lowest. This shows that there are different amounts and/or types of antioxidants in different cultivars. The values found in the current study are similar to those reported by Melo, Maciel, Lima & Nascimento (2008) who analysed aqueous and acetone extracts of 15 different cultivars and found values from 3.33 to 61.03% inhibition for the aqueous extract and 3.89-67.25% for the acetone extract. Elliot, Bluecrop, Coville, Powderblue, Briteblue, Florida, Climax e Darrow obtained values of >50% inhibition. According to Melo et al. (2008) this can be considered to be a moderate antioxidant level, similar to the aqueous extract of pinha (*Annona squamosa*) and the acetone extract of guava, the fruit with the highest antioxidant values reported by them.

The principal components analysis (PCA) was applied to the hydrophilic extracts of different cultivars (**Figure 1.1**), allowed the grouping of cultivars according to the producer and within each group there is a separation based on the different harvest seasons. The 2010/2011 harvest had higher positive scores in PC2, while the 2011/2012 harvest had negative scores (**Figure 1.1 (e)**).

The plot of the principal axes (PCs) that are associated with each variable is shown in **Figure 1.1**. The PCA showed that the first principal component (PC1) explained 49.31% of the total variance in the data. The second principal component (PC2) explained 19.98%, while the third and fourth principal components explained 14.80% and 8.74% respectively, these observations may be made in the sample score plot (**Figure 1.1**). The PC1 is primarily related to the analysis of phenolic compounds, anthocyanins, FRAP and ABTS, while the second principal component is related to the ORAC value (**Figure 1.1(b)**).

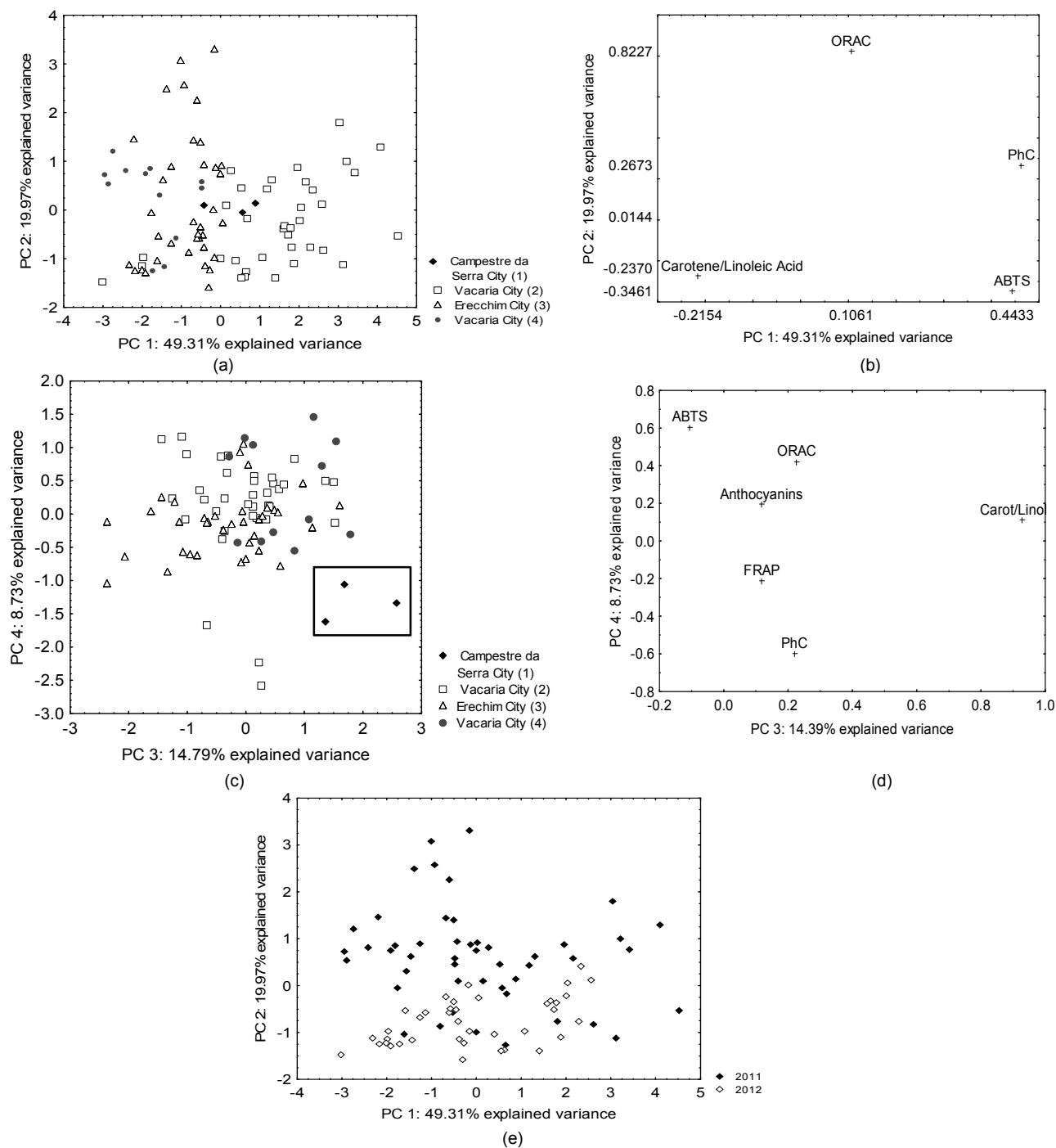


Figure 1.1 Principal component analysis (PCA) of hydrophilic extracts of different blueberry cultivars. Percentages of four products and two harvests, (a) Graph of scores for PC1 (factor 1) and PC2 (factor 2), differences between classes (producers); (b) Graph of loadings for PC1 (factor 1) and PC2 (factor 2); (c) Graph of scores for PC3 (factor 3) and PC4 (factor 4); (d) Graph of loadings for PC3 (factor 3) and PC4 (factor 4); (e) Graph of scores for PC1 (factor 1) and PC2 (factor 2), differences between class (harvest). *PhC = Phenolic compounds

The two principal components (PC1 and PC2) explain 69% of the variance in the data. The third and fourth principal components have a high contribution due to the β -carotene/linoleic acid assay and total phenolic compounds (**Figure 1.1(d)**), making it possible to distinguish between hydrophilic extracts by producer 1, from the city of Campestre da Serra (**Figure 1.1(c)**).

Table 1.4 shows the two analyses for antioxidant activity and concentration of carotenoids in lipophilic extracts. The Elliott cultivar had the highest concentration of carotenoids, but there was a difference between different harvest seasons and locations. When harvested in Campestre da Serra in 2010/2011, there were more carotenoids (35.2 μg of β -carotene/g DW) than when harvested in Vacaria in 2011/2012 (24.6 μg of β -carotene/g DW). The range of concentrations of carotenoids for different cultivars and harvest seasons was 1.65 μg of β -carotene/g DW for the Powderblue cultivar and 35.2 μg of β -carotene/g DW for the Elliot cultivar. This low level of carotenoids in blueberries was also verified by others (Marinova e Ribarova, 2007; Jacques et al., 2010). Jacques et al. (2009) also found that Powderblue had the lowest level of carotenoids among the seven samples analysed. This is due to the fact that the primary antioxidants are anthocyanins. Fruits with relatively high concentrations of anthocyanins have a lower concentration of carotenoids during the ripening process.

There was a range of 0.28-16.3 $\mu\text{mol TE/g DW}$ in the ABTS antioxidant assay for lipophilic extracts (**Table 1.4**), which is five to 500-fold lower than the hydrophilic extracts (**Table 1.3**). This was also seen by Kotíková, Lachman, Hejtmánková & Hejtmánková (2011), who found much less antioxidant activity in the lipophilic extracts of tomatoes than in hydrophilic extracts. The same authors found $<10 \mu\text{mol TE/g DW}$ for the different varieties analysed, which is comparable to the levels found in blueberries in the current study.

The low antioxidant values for the lipophilic extracts (**Table 1.4**) can be attributed to the antioxidant mechanisms in the different assays done in this study. That is, Rodriguez-Amaya, Kimura & Amaya-Farfan (2008) found that carotenoids are very efficient in controlling singlet oxygen, while phenolic compounds can sequester free radicals (ORAC) and transfer of electrons (ABTS) better.

The results from the ABTS assay of lipophilic extracts were considerably higher than the ORAC values for the same extracts (**Table 1.4**). The cultivars harvested in 2010/2011 were significantly higher ($p \leq 0.05$) than the 2011/2012 harvest. The ORAC values ranged from 0.04 $\mu\text{mol TE/g DW}$ for Climax and 1.13 $\mu\text{mol TE/g DW}$ for Darrow, but were less than those reported by Prior et al. (2003) for pine nuts, sorghum bran and strawberries, which varied from 3.0 to 16.0 $\mu\text{mol TE/g DW}$. The ORAC values did not correlate well with total carotenoids (0.58). That can be due to the fact that carotenoids are not the only compounds with antioxidant activities in lipophilic extracts. As reported by Pertuzatti et al. (2012) lipophilic extracts of blueberries have a large amount of tocopherols.

Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries

Table 1.4 Concentration of total carotenoids and antioxidant activity of lipophilic extracts of blueberries, determined by the ABTS and ORAC methods.

Cultivar	Carotenoides ($\mu\text{g de } \beta\text{caroteno/g DW}$)		ABTS ($\mu\text{mol TE/g DW}$)		ORAC ($\mu\text{mol TE/g DW}$)	
	2010/2011 Harvest	2011/2012 Harvest	2010/2011 Harvest	2011/2012 Harvest	2010/2011 Harvest	2011/2012 Harvest
Elliot – 1	35.2 $\pm$ 0.35a	---	10.0 $\pm$ 0.6cde	---	0.22 $\pm$ 0.02cdef	---
Florida – 2	2.29 $\pm$ 0.11gB	2.84 $\pm$ 0.17fgA	12.6 $\pm$ 1.1bA	1.26 $\pm$ 0.03aB	0.07 $\pm$ 0.01hA	0.07 $\pm$ 0.00defA
Bluecrop – 2	10.7 $\pm$ 0.99eA	7.69 $\pm$ 0.44bB	9.0 $\pm$ 0.5defA	0.33 $\pm$ 0.02efB	0.52 $\pm$ 0.09bA	0.11 $\pm$ 0.02bcB
Elliot – 2	14.9 $\pm$ 1.42dA	7.76 $\pm$ 0.28bB	11.8 $\pm$ 0.7bcA	0.35 $\pm$ 0.05efB	0.58 $\pm$ 0.03bA	0.09 $\pm$ 0.01bcdB
Climax – 2	15.8 $\pm$ 0.05gB	3.71 $\pm$ 0.16efA	4.8 $\pm$ 0.4gA	0.43 $\pm$ 0.06defB	0.12 $\pm$ 0.02fghA	0.04 $\pm$ 0.01efB
Powderblue – 2	1.65 $\pm$ 0.03gB	5.36 $\pm$ 0.54cdA	9.8 $\pm$ 0.8cdeA	0.99 $\pm$ 0.12bB	0.09 $\pm$ 0.01ghA	0.05 $\pm$ 0.00defB
Bluegem – 2	3.72 $\pm$ 0.21fgA	2.30 $\pm$ 0.24gB	8.2 $\pm$ 0.8efA	0.80 $\pm$ 0.11bcB	0.09 $\pm$ 0.02ghA	0.08 $\pm$ 0.01cdeA
Powderblue – 3	2.87 $\pm$ 0.15fgB	5.99 $\pm$ 0.41cA	16.2 $\pm$ 1.1aA	1.21 $\pm$ 0.09aB	0.12 $\pm$ 0.01fghA	0.09 $\pm$ 0.00cdB
Briteblue – 3	3.48 $\pm$ 0.28fgB	5.74 $\pm$ 0.31cdA	11.9 $\pm$ 1.1bcA	0.28 $\pm$ 0.04fB	0.16 $\pm$ 0.01efghA	0.07 $\pm$ 0.00defB
Woodard – 3	3.33 $\pm$ 0.28fgB	4.65 $\pm$ 0.49deA	11.0 $\pm$ 0.9bcdA	0.41 $\pm$ 0.05efB	0.18 $\pm$ 0.00defgA	0.04 $\pm$ 0.00efB
Florida – 3	1.99 $\pm$ 0.17gB	2.59 $\pm$ 0.25fgA	16.3 $\pm$ 0.8aA	0.63 $\pm$ 0.09cdB	0.12 $\pm$ 0.01fghA	0.04 $\pm$ 0.01fB
Climax – 3	2.49 $\pm$ 0.07gB	4.02 $\pm$ 0.28eA	6.8 $\pm$ 0.7fgA	0.94 $\pm$ 0.08bB	0.24 $\pm$ 0.01cdeA	0.13 $\pm$ 0.01bB
Bluegem – 3	5.36 $\pm$ 0.28fA	5.18 $\pm$ 0.38cdA	15.8 $\pm$ 0.9aA	0.54 $\pm$ 0.05deB	0.29 $\pm$ 0.03cdA	0.04 $\pm$ 0.00fB
Elliot – 4	8.71 $\pm$ 0.66eB	24.6 $\pm$ 0.61aA	8.7 $\pm$ 0.7defA	0.92 $\pm$ 0.06bB	0.51 $\pm$ 0.02bA	0.26 $\pm$ 0.04aB
Darrow – 4	25.8 $\pm$ 0.26b	---	9.9 $\pm$ 0.7cde	---	1.13 $\pm$ 0.09a	---
Bluecrop – 4	18.0 $\pm$ 0.74c	---	1.9 $\pm$ 0.2h	---	0.30 $\pm$ 0.04c	---

Averages followed by the same upper case letters on the same row and lower case letters in different columns do not differ significantly $p \leq 0.05$ by the Tukey test; TE = Trolox equivalent; DW = dry weight; Coefficient of variation < 9.8

According to the PCA of the lipophilic extracts (**Figure 1.2**), there was a high degree of homogeneity in 2011/2012 harvest. There was a separation between the Rabbiteye and Highbush cultivars in 2010/2011 harvest. This could be due to the fact that Highbush had higher values in the first principal component (**Figure 1.2(a)**), which separated from the others due to having the highest concentration of carotenoids and ORAC value. These are the analyses that are distinguished in the principal component (**Figure 1.2(b)**). The Rabbiteye cultivar in the upper left quadrant had high positive scores in PC2 and near zero in PC1. When comparing the loadings (**Figure 1.2(b)**) it can be seen that this is due to the fact that the samples in this group have lower concentrations of total carotenoids (related to PC1) and the highest values of ABTS (related to PC2). PC1 explains 56.32% of the total variance in the data, while PC2 explains 32.30%. So, these two principal components describe > 88% of the variance in the data.

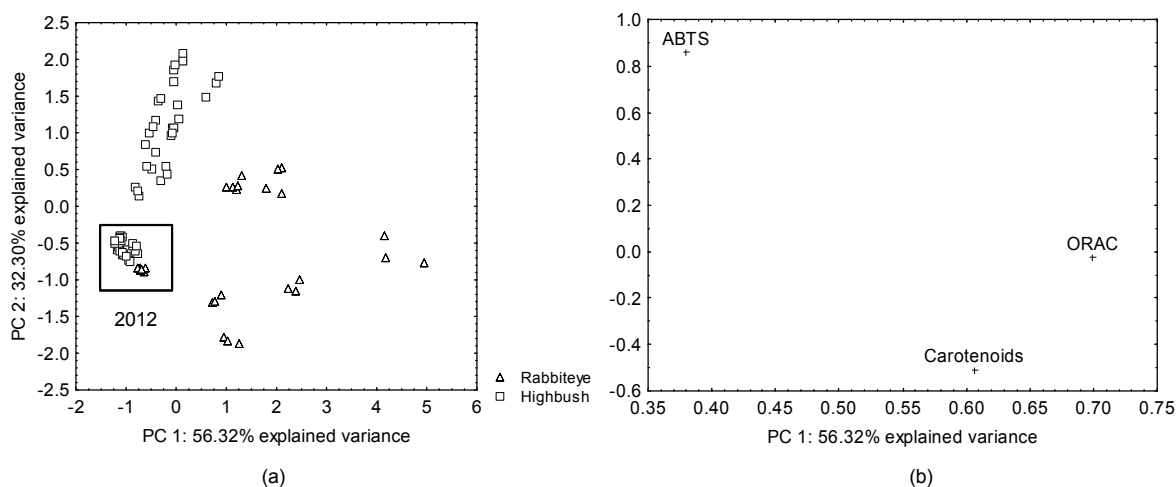


Figure 1.2 Principal component analysis (PCA) of lipophilic extracts of blueberry cultivars. Percentages of four products and two harvests, (a) Graph of scores for PC1 (factor 1) and PC2 (factor 2), (b) Graph of loadings.

4 CONCLUSION

The results show that Brazilian blueberries have a relatively high concentration of phenolic compounds and total anthocyanins, along with a small concentration of carotenoids. It was also shown that these compounds have a positive correlation with antioxidant activity, which was higher in the hydrophilic vs lipophilic extracts. Significant differences in the concentrations of bioactive compounds were found in different cultivars, places where they were grown and harvest season. By PCA, it was possible to see that the hydrophilic extracts could be differentiated by producers and harvest seasons. The lipophilic extracts were differentiated according to whether they were Rabbiteye or Highbush.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to acknowledge CAPES for their financial support, as well as UNICAMP, UFMT and UCLM for inspiring this research.

6 REFERENCES

- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.
- Arancibia-Avila, P., Namiesnik, J., Toledo, F., Werner, E., Martinez-Ayala, A. L., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., & Gorinstein, S. (2012). The influence of different time durations of thermal processing on berries quality. *Food Control*, 26, 587-593.
- Barcia, M. T., Jacques, A. C., Pertuzatti, P. B., & Zambiasi, R. C. (2010). Determination by HPLC of ascorbic acid and tocopherols in fruits. *Semina: Ciências Agrárias*, 31, 381-390.

- 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.
- Bochi, V. C., Barcia, M., Rodrigues, D., Speroni, C. S., Giusti, M. M., & Godoy, H. T. (2014). Polyphenol extraction optimization from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. *Food Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.031>.
- Castrejón, A. D. R., Eichholz I., Rohn, S., Kroh, L.W., & Huyskens-Keil S. (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109, 564-572.
- Connor, A. M., Luby, J. J., & Tong, C. B. S. (2002). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of American Society Horticultural Science*, 127(2), 238-244.
- Dastmalchi, K., Flores, G., Petrova, V., Pedraza-Peñalosa, P., & Kennedy, E. J. (2011). Edible neotropical blueberries: antioxidant and compositional fingerprint analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3020-3026.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Batolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48-54.
- Gao, L. & Mazza, G. (1994). Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics in blueberries. *Journal of Food Science*, 59, 1057–1059.

- Giusti, M. M., & Jing, P. (2007). Natural pigments of berries: Functionality and application. In: Zhao, Y. Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion; CRC PRESS.
- Giusti, M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 61, 322-326.
- Hakkinen, S. H., & Torronen, A. R. (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and Vaccinium species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 33, 517-524.
- INMET (Instituto Nacional de Meteorologia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil). Estações Automáticas: Gráficos, 2013. URL http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_automatizadas. Accessed 04/01/13.
- Jacques, A. C., Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., & Zambiasi, R. C. (2009). Scientific notes: bioactive compounds in small fruits cultivated in the southern region of Brazil. *Brazilian Journal of Food Technology*, 12, 123-127.
- Jacques, A. C., Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Zambiasi, R. C., & Chim, J. F. (2010). Stability of bioactive compounds in frozen pulp of blackberry (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy. *Química Nova*, 33, 1720-1725.
- Kotíková, Z., Lachman, J., Hejtmánková, A., & Hejtmánková, K. (2011). Determination of antioxidant activity and antioxidant content in tomato varieties and evaluation of mutual interactions between antioxidants. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 1703-1710.

- Krikorian, R., Shidler, M. D., Nash, T. A., Kalt, W., Vinqvist-Tymchuk, M. R., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J. A. (2010). Blueberry Supplementation Improves Memory in Older Adults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3996–4000.
- Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *The Journal of the American Oil Chemists Society*, 45, 594-598.
- Marinova, D., & Ribarova, F. (2007). HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 370-374.
- Melo, E. A., Maciel, M. I. S., Lima, V. L. A. G., & Nascimento, R. J. (2008). Capacidade antioxidante de frutas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44 (2), 193-201.
- Moraes, J. O., Pertuzatti, P. B., Corrêa, F. V., & Salas-Mellado, M. M. (2007). Study of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) in the process of food products. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(supl), 18-22.
- Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519-525.
- Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30, 134-144.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
- Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Jacques, A. C., Vizzotto, M., Godoy, H. T., & Zambiasi, R. C. (2012). Quantification of several bioactive compounds and

- antioxidant activities of six cultivars of brazilian blueberry. *The Natural Products Journal*, 2, 188-195.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., Mcewen, J., O'brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., & Mainland, C. M. (1998). Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2686-2693.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchioga, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3273-3279.
- 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 & Medicine*, 26, 1231-1237.
- Rebello, L. P. G., Ramos, A. M., Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Castillo-Muñoz, N., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2014). Flour of banana (Musa AAA) peel as a source of antioxidant phenolic compounds. *Food Research International*, 55, 397-403.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods*, ILSI Press. Publisher: Washington, D.C.
- Rodriguez-Amaya, D. B., Kimura, M., & Amaya-Farfan. (2008). *Fontes Brasileiras de Carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos*, Brasília:MMA/SBF.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry,

- and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells In Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9329-9339.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of Total Phenols and Others Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299,152.
- Smith, S. H., Tate, P. L., Huang, G., Magee, J. B., Meepagala, K. M., Wedge, D. E. & Larcom, L. L. (2004). Antimutagenic activity of berry extracts. *Journal of Medicinal Food*, 7(4), 450-455.
- Taruscio, T. G., Barney, D. L., & Exon, J. (2004). Content and Profile of Flavanoid and Phenolic Acid Compounds in Conjunction with the Antioxidant Capacity for a Variety of Northwest *Vaccinium* Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3169-3176.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zenillos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.
- Wang, S. Y., Chen, H., Camp, M. J., & Ehlenfeldt, M. K. (2012). Genotype and growing season influence blueberry antioxidant capacity and other quality attributes. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 1540-1549.

ARTIGO 2

**Anthocyanins profile of Rabbiteye and Highbush blueberries using
HPLC-DAD-ESI-MSⁿ and multivariate analysis**

Anthocyanins profile of Rabbiteye and Highbush blueberries using HPLC-DAD-ESI-MSⁿ and multivariate analysis

Paula Becker Pertuzatti^{a,b,*}, Milene Teixeira Barcia^a, Ligia Portugal Gomes Rebello^c,
Sérgio Gómez-Alonso^{d,e}, Isidro Hermosín-Gutiérrez^d, Helena Teixeira Godoy^a

^a Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato 80, 13083-862 Campinas, Brazil

^b Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de Mato Grosso, Avenida Governador Jaime Campos 6.390, 78600-000 Barra do Garças, Brazil

^c Instituto Federal Fluminense, Avenida Dário Vieira Borges 235, 28360-000 Bom Jesus do Itabapoana, Brazil

^d Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. Camilo José Cela S/N, 13071 Ciudad Real, Spain

^e Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Paseo de la Innovación, 1, 02006, Albacete, Spain.

* Corresponding author. Tel.: +55 (66) 34057203; fax: +55 (66) 34021110

Email adress: paulapertuzatti@yahoo.com.br (P. Pertuzatti).

ABSTRACT

The anthocyanin profile and total content of four Highbush blueberry cultivars (Darrow, Bluecrop, Elliot and Coville) and six Rabbiteye blueberry cultivars (Florida, Powderblue, Climax, Bluegem, Briteblue and Woodard) grown in Brazil during two consecutive harvests were determined using HPLC-DAD-ESI-MSⁿ and compared by multivariate analysis. A total of up to 30 anthocyanins were found, comprising the complete series of six kinds of glycosides, namely galactoside, glucoside, arabinoside, xyloside, acetylgalactoside and acetylglucoside of five anthocyanidins, namely delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin and malvidin, together with 6 additional malonyl derivatives of the main anthocyanidin hexosides. Four different anthocyanin profiles were established on the basis of the relative distribution of the 30 anthocyanins belonging to the aforementioned complete series of anthocyanins. Acetylated anthocyanins were not found in any of the Rabbiteye cultivars and also in some of the Highbush samples. In addition, the Rabbiteye cultivars showed higher proportions of cyanidin 3-galactoside than the Highbush cultivars, the latter accounting for higher proportions of the 3-arabinosides of delphinidin and malvidin. The range for the total anthocyanin content of the tested samples was between 10.8–26.5 g/kg DW, as malvidin 3-glucoside equivalent, and the amount of anthocyanin in fruits was size dependent, the lower size Rabbiteye cultivars showing higher levels of anthocyanins than the higher size Highbush cultivars.

Keywords: *Vaccinium ashei* Reade, *Vaccinium corymbosum* L., anthocyanins; blueberry, Highbush, Rabbiteye, LCMS

1 INTRODUCTION

Blueberry is a fruit belonging to the family of Ericaceae and extensively cultivated in North America. In Brazil, blueberry commercialization started in the 1990s (Moraes, Pertuzatti, Corrêa & Salas-Mellado, 2007) and currently two main species are produced and commercialized, the Rabbiteye (*Vaccinium ashei* Reade) and the Northern Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). The most of the Brazilian blueberries production is consumed *in natura* or even exported. Interestingly, Brazil has the potential to produce blueberries throughout the year. Thus, an important economic aspect is to produce Brazilian blueberries at least since December up to February, just in the meantime between the harvest seasons in the main consumer centers located in the USA and the European Union (Pertuzatti et al., 2012).

Blueberries had been reported to show the highest antioxidant activity among 42 fruits and vegetables (Prior et al., 1998). Based on that, several studies were made to identify bioactive compounds such as flavonols, phenolic acids, carotenoids, tocopherols and vitamin C, in blueberries (Barcia, Jacques, Pertuzatti & Zambiasi, 2010; Borges, Degeneve, Mullen & Crozier, 2010; Pertuzatti et al. 2012; Ma et al., 2013).

Among the bioactive compounds commonly found in blueberries, anthocyanins have been extensively studied. However, information on structures and concentrations of anthocyanins in blueberries are still incomplete, due in part to limitations in analytical instrumentation. For this reason, most studies that identify anthocyanins in blueberry usually report for no more than 20 anthocyanins, including non-acylated and acylated glycosides (Gao & Mazza, 1994; Gao & Mazza, 1995; Kader, Rovel, Girardin & Metche, 1996; Prior et al., 2001; Cho, Howard, Prior &

Clark, 2004; Lohachoompol, Mullholland, Srzednicki & Craske, 2008; Wang, Chen, Sciarappa, Wang & Camp, 2008; Borges, Degeneve, Mullen & Crozier, 2010; Sun et al., 2012; Ma et al., 2013; Yousef et al., 2013).

The objective of this study was to use HPLC-DAD-ESI-MSⁿ data for the identification and quantitation of the most complete anthocyanin profile and the application of chemometrics tools allowing the differentiation between different cultivars of the two main blueberry species produced in Brazil.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals and Reagents

All solvents were of LC-MS quality and all chemicals of analytical grade (>99%). Water was of Milli-Q quality. Commercially available standards of anthocyanins were used for identification: malvidin 3-galactoside (Extrasynthese, Genay, France) and the 3-glucosides of cyanidin, petunidin and malvidin (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Germany). Quantitation by means of calibration curves, covering the expected concentration ranges, was made as malvidin 3-glucoside equivalents. .

2.2 Samples

Approximately 2 kg of each sample from ten blueberry cultivars from two harvests, 2010/2011 and 2011/2012 were provided by four producers of three different cities of Rio Grande do Sul – Brazil and are shown in **Table 2.1**.

The fruits were cut in half, frozen and lyophilized in a Terroni Freeze-dryer, model LS-3000E, São Paulo, Brazil. Liquid nitrogen was further added to their freeze-dried samples and they were crushed in a mortar. Then they were placed in aluminum bags, air-evacuated, stored at -20°C and used as feed-stock for experiments in this study.

Table 2.1 Different blueberries cultivars, groups and producers, with their respective locations of origin.

Cultivar	Group	Producer	City	2010/2011 harvest	2010/2011 harvest	2010/2011 harvest	2011/2012 harvest	2011/2012 harvest	2011/2012 harvest
				Transversal Diameter	Longitudinal Diameter	Weigh	Transversal Diameter	Longitudinal Diameter	Weigh
Bluecrop	Highbush	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)	12.42±0.9	18.12±3.7	2.35	12.04±0.9	16.59±1.7	1.89
Bluecrop	Highbush	4	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)	11.21±1.0	14.67±1.2	1.53	-	-	-
Coville	Highbush	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)	-	-	-	14.18±0.6	18.73±0.9	2.00
Darrow	Highbush	4	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)	10.81±1.1	14.96±1.9	1.59	-	-	-
Elliot	Highbush	1	Campestre da Serra (28° 47' S, 51° 05' W)	10.07±1.4	13.33±2.0	1.32	-	-	-
Elliot	Highbush	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)	11.50±0.5	15.44±0.7	1.52	11.77±0.8	15.55±1.2	1.57
Elliot	Highbush	4	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)	10.87±0.7	14.11±1.2	1.26	11.64±1.5	16.03±2.6	2.02
Bluegem	Rabbiteye	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)	10.44±0.9	13.01±0.9	1.12	11.13±0.8	13.93±1.1	1.28
Bluegem	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)	11.01±1.0	13.48±1.2	1.25	11.67±1.0	14.81±1.1	1.56
Briteblue	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)	10.90±0.9	12.76±0.9	1.21	9.57±0.6	11.53±0.8	0.78
Climax	Rabbiteye	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)	10.85±0.8	11.84±0.9	0.97	12.44±0.9	13.38±0.9	1.37
Climax	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)	12.37±0.8	13.18±0.8	1.31	12.56±0.7	13.45±0.8	1.40
Florida	Rabbiteye	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)	10.52±0.9	12.36±1.0	0.97	11.69±0.8	13.29±0.9	1.23
Florida	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)	12.66±0.8	14.49±1.1	1.63	11.61±1.1	13.21±1.1	1.25
Powderblue	Rabbiteye	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)	11.03±0.8	13.87±1.0	1.40	11.63±0.7	13.51±1.2	1.23
Powderblue	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)	12.03±1.1	14.60±1.2	1.59	10.65±1.0	12.78±1.3	1.09
Woodard	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)	10.77±0.7	12.46±0.9	1.08	9.97±0.7	11.82±0.8	0.87

2.3 Biometric Measurements

Longitudinal and transversal diameters were measured using an electronic caliper with resolution of 0.01/0.0005 mm and precision of 0.01 mm (Jomarca, São Paulo, Brazil). A total of 50 berries from each sampling date were used for size measurements and average berry weight.

2.4 Sample preparation for analysis of anthocyanins

Lyophilized samples in amount of 0.5 g were extracted with 25 mL of mixture 50:48.5:1.5 (v/v) of CH₃OH/H₂O/HCOOH, helped by ultrasonic bath, during 2 minutes and then centrifuged at 6000g at 5°C for 5 minutes, filtered and extracted once again with other 25 mL of extraction solution, making up to volume in a 50 mL volumetric flask. These two-step extraction of the samples yielded nearly 99% of the sample anthocyanin content, as confirmed by HPLC of six successive extraction steps. After extraction, the samples extracts were stored in amber glass bottles at -18°C until analyses, when 0.5 mL of samples extracts were diluted in 0.5 mL of Mili-Q water before injection in the HPLC system for their analysis.

2.5. Determination of anthocyanins by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ

HPLC separation, identification and quantitation of anthocyanins were performed on an Agilent 1100 Series system (Agilent, Germany), equipped with DAD (G1315B) and a LC/MSD Trap VL (G2445C VL) electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MSⁿ) system, and coupled to an Agilent ChemStation (version B.01.03) data-processing station. The mass spectra data were processed with the Agilent LC/MS Trap software (version 5.3).

The anthocyanins extracts (10 µL) were separated, on a reversed-phase column Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1x150 mm; 3.5 µm particle; Agilent, Germany), thermostated at 40°C. We used a previously described method (Barcia et al., 2014). The mobile phase was based on mixtures of water, acetonitrile and formic acid (88.5:3:8.5,

v/v/v, solvent A; 41.5:50:8.5, v/v/v, solvent B). The linear solvents gradient was as follows: 0 min, 94% A, and 6% B; 10 min, 70% A, and 30% B; 30 min, 50% A, 50% B; 34 min, 0% A, 100% B; 36 min, 0% A, 100% B; 42 min, 94% A and 6% B. The flow rate was 0.19 mL/min.

For identification, ESI-MSⁿ was used employing the following parameters: positive ionization mode; dry gas, N₂, 11 mL/min; drying temperature, 350°C; nebulizer, 65 psi; capillary, -2500 V; capillary exit offset, 70 V; skimmer 1, 20 V; skimmer 2, 6 V; compound stability, 100%; scan range, 50-1200 m/z. For quantitation, DAD chromatograms were extracted at 520 nm, and their concentrations were expressed as equivalents of malvidin 3-glucoside. Identification was mainly based on UV-vis and MS/MS spectral data, which matched with those obtained for authentic standards or reported in literature (Castillo-Muñoz et al., 2009, Nixford, & Hermosín-Gutiérrez, 2010). In case of overlapping peaks in the DAD-chromatograms (**Figure 2.1**), the separate quantitation was possible in some cases with the help of the extracted ion chromatograms (EIC) at the *m/z* values of the corresponding molecular ions of each overlapping compound: the EIC integral value was used for an estimation of the contribution of each individual overlapping compound to the joint DAD peaks.

The total content of anthocyanins was calculated from the total sum of the chromatographic areas corresponding to all the identified peaks (total chromatographic area). In addition, the molar percentage of each anthocyanin was obtained as the ratio of individual chromatographic area with regards to the total chromatographic area.

2.6. Statistical analysis

Data analysis was carried out with ANOVA and Tukey' test focusing on significant differences in means. Correlations among data obtained were calculated using Pearson's correlation coefficient (*r*). Statistic 7.0 software program was employed

with significance level between mean differences at 5% ($p < 0.05$). Principal component analysis (PCA), was performed using Pirouette 3.11 program. The data were previously auto-scaled, before submitted to principal component analysis. All analyses were made in triplicates and the results were given as mean values with their corresponding standard deviations.

3 RESULTS AND DISCUSSION

A total of 36 anthocyanins were detected in the blueberry extracts analysed. The assignation of 30 of the latter anthocyanins was made on the basis of their characteristic UV-vis and MS-MS spectral data (**Table 2.2**; peaks 1 – 30). These anthocyanins derived from five anthocyanidins, namely delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin and malvidin. In agreement with literature data, anthocyanins based on pelargonidin were not found (Borges, Degeneve, Mullen & Crozier, 2010; Ma et al. 2013; Yousef et al. 2013). The anthocyanins found in the blueberry extracts comprised the complete series of the galactoside, glucoside, arabinoside, an unknown pentoside which very likely is xyloside (Lätti, Kainulainen, Hayirlioglu-Ayaz, Ayaz & Riihinen, 2009), acetylgalactoside and acetylglucoside derivatives of the five aforementioned anthocyanidins. The main anthocyanins reported in blueberry has been usually limited to the 20 non-acylated glycosides, namely the galactoside, the glucoside, the arabinoside, and the less occurring xyloside of five anthocyanidins, including delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin and malvidin (Kader, Rovel, Girardin & Metche, 1996; Cho, Howard, Prior & Clark, 2004; Lohachoompol, Mullholland, Srzednicki & Craske, 2008; Wang, Chen, Sciarappa, Wang & Camp, 2008; Borges, Degeneve, Mullen & Crozier, 2010; Sun et al., 2012; Ma et al., 2013; Yousef et al., 2013). In addition, acylated anthocyanidins has been also reported, thus increasing the number of blueberry anthocyanins up to 27 (Wu & Prior, 2005), and even up to 49 in some wild species in which diglycosides were also detected (Nicoué, Savard &

Belkacemi, 2007). The acylated anthocyanins found in blueberries include acetyl (Gao & Mazza, 1994; Gao & Mazza, 1995; Prior et al., 2001), malonyl (Wu & Prior, 2005), oxalyl, propionyl and succinyl (Nicoué et al., 2007) derivatives of the main non-acylated anthocyanins. The occurrence of malonylhexoside derivatives of anthocyanidins in some of the analysed samples in this study, up to 6 malonyl derivatives of the galactosides and glucosides of delphinidin, cyanidin and malvidin, was suggested on the basis of the detection of signals at the m/z values expectable for their corresponding molecular ions (**Table 2.2**; peaks A – F). The latter compounds accounted for very low concentrations and partially co-eluted with other anthocyanins. For this reason, and also because of the lack of stronger evidence of their occurrence, the latter compounds were not quantitated in this work.

Table 2.2 Retention times and Mass Spectral (positive ionization mode) and UV-Vis data of anthocyanins identified in blueberries

peak	Assignment	HPLC t_R (min)	UV-vis maxima (nm)	Molecular and product ions (m/z)
1	delphinidin 3-galactoside	8.12	276, 298sh, 346, 435sh, 522	465; 303
2	delphinidin 3-glucoside	10.36	276, 298sh, 346, 435sh, 522	449; 287
3	cyanidin 3-galactoside	12.38	280, 328, 377sh, 430sh, 516	465; 303
4	delphinidin 3-arabinoside	13.15	276, 298sh, 346, 435sh, 522	435; 303
5	cyanidin 3-glucoside	16.71	280, 328, 377sh, 430sh, 516	449; 287
6	cyanidin 3-arabinoside	19.05	280, 328, 377sh, 430sh, 516	419; 287
7	petunidin 3-galactoside	19.36	276, 298sh, 346, 435sh, 523	479; 317
8	petunidin 3-glucoside	21.86	276, 298sh, 346, 435sh, 525	479; 317
9	delphinidin 3-pentoside	22.22	276, 298sh, 346, 435sh, 525	435; 303
10	peonidin 3-galactoside	22.99	280, 328, 377sh, 430sh, 517	463; 301
11	petunidin 3-arabinoside	23.51	276, 298sh, 346, 435sh, 526	449; 317
12	delphinidin 3-acetylgalactoside	25.06	276, 298sh, 346, 435sh, 521	507; 303
13	peonidin 3-glucoside	25.06	280, 328, 377sh, 430sh, 517	463; 301
14	malvidin 3-galactoside	25.78	277, 298sh, 346, 435sh, 527	493; 331
15	cyanidin 3-pentoside	25.78	ND	419; 287
16	peonidin 3-arabinoside	26.24	279, 328, 377sh, 430sh, 517	433; 301
17	malvidin 3-glucoside	27.33	277, 298sh, 346, 435sh, 527	493; 331
18	cyanidin 3-acetylgalactoside	27.33	ND	491; 287
A	delphinidin 3-malonylgalactoside	27.80	ND	551
19	petunidin 3-pentoside	28.34	277, 298sh, 346, 435sh, 526	449; 317
B	delphinidin 3-malonylglucoside	28.34	ND	551
20	malvidin 3-arabinoside	28.71	277, 298sh, 346, 435sh, 528	463; 331
21	delphinidin 3-acetylglucoside	28.71	ND	507; 303
C	cyanidin 3-malonylgalactoside	29.90	ND	535
22	petunidin 3-acetylgalactoside	30.11	277, 298sh, 346, 435sh, 529	521; 317
E	malvidin 3-malonylgalactoside	30.70	ND	579
23	peonidin 3-pentoside	31.02	~ 521	433; 301
D	cyanidin 3-malonylglucoside	31.02	ND	535
24	cyanidin 3-acetylglucoside	31.59	279, 328, 377sh, 430sh, 517	491; 287
25	peonidin 3-acetylgalactoside	32.71	~ 521	505; 301
26	malvidin 3-pentoside	32.98	277, 298sh, 346, 435sh, 528	463; 331
F	malvidin 3-malonylgalactoside	33.30	ND	579
27	petunidin 3-acetylglucoside	33.41	277, 298sh, 346, 435sh, 528	521; 317
28	malvidin 3-acetylgalactoside	34.40	277, 298sh, 346, 435sh, 529	535; 331
29	peonidin 3-acetylglucoside	36.10	279, 328, 377sh, 430sh, 517	505; 301
30	malvidin 3-acetylglucoside	37.19	277, 298sh, 346, 435sh, 529	535; 331

ND = Not detected

Regarding the anthocyanin chromatographic profiles, the blueberry cultivars studied in this work presented different characteristic patterns of anthocyanins (**Figure 2.1**). With regards to the anthocyanidin core, the anthocyanins found in all the samples of Highbush cultivars mainly derived from the B-ring trisubstituted anthocyanidins, namely delphinidin, petunidin and malvidin. In the case of the Rabbiteye cultivars, most samples showed a balanced predominance of the non-methoxylated B-ring anthocyanidins, the trisubstituted delphinidin and disubstituted cyanidin, together with

the methoxylated trisubstituted malvidin, and the proportion of peonidin was unusually high. For the rest of the Rabbiteye cultivars, most samples of Powderblue showed a distribution of anthocyanidins similar to Highbush cultivars and the samples of Briteblue and Woodard stood out because they accounted for similar proportions of the five detected anthocyanidins. Most literature data has reported that the main blueberry anthocyanins derive from delphinidin, petunidin and malvidin; however, cyanidin-based anthocyanins has been also found as relevant contributors in some cases, but peonidin-based anthocyanins was always found as minor or even undetectable compounds (Gao & Mazza, 1994; Koponen, Happonen, Mattila & Törrönen, 2007; Lätti et al., 2009; Wang et al., 2008; Wang et al., 2012).

In addition to the anthocyanidin core, the type and the relative importance of the different glycosides for a given anthocyanidin contributed to increase the variations observed among the anthocyanin profiles, which could be summarized in four different types. The first anthocyanin profile was characterized by the occurrence of all the 36 identified anthocyanins, mainly built from the delphinidin, petunidin and malvidin (all of them B-ring trisubstituted anthocyanidins), being the main glycosides those derived from galactose, glucose and arabinose, together with minor proportions of the xyloside derivatives and being the only profile in which the acetylglucose and acetylgalactose derivatives were detected (**Figure 2.1 (a)**). The second anthocyanin profile was also predominantly based in B-ring trisubstituted anthocyanidins and showed only 15 anthocyanins, being the galactoside and arabinoside derivatives the main glycosides, together with minor proportions of the glucoside derivatives (**Figure 2.1 (b)**). The third anthocyanin profile accounted for 20 peaks, mainly derived from delphinidin, cyanidin and malvidin, predominantly as their corresponding galactosides and arabinosides, and also including the glucosides as relevant anthocyanins and the xylosides as minor

compounds (**Figure 2.1 (c)**). Finally, the fourth anthocyanin profile accounted for the same 20 anthocyanins detected in the third profile, but now the five anthocyanidins accounted for similar proportions and the distribution of the types of glycosides differed according to the occurrence of methoxylation in the anthocyanidin core (**Figure 2.1 (d)**): for the non-methoxylated anthocyanidins (delphinidin and cyanidin) the decreasing order of the proportions of glycosides was galactoside $\approx$ glucoside > arabinoside >> xyloside; while for the methoxylated anthocyanidins (peonidin, petunidin and malvidin) the order was glucoside > galactoside > arabinoside >> xyloside. Most samples of Highbush blueberry cultivars showed the first anthocyanin profile (**Figure 2.1 (a)**), including those of Bluecrop, Darrow and Elliot, the latter only from producers 1 and 4. However, the samples of the Highbush cultivars Coville and those of Elliot from producer 2 showed the second anthocyanin profile (**Figure 2.1 (b)**), together with the Rabitteye cultivar Powderblue, with the only exception of the sample of producer 2 from the harvest 2011/2012. The latter Powderblue sample and most other Rabitteye cultivars, namely Bluegem, Climax and Florida, showed the third anthocyanin profile (**Figure 2.1 (c)**). Finally, the fourth anthocyanin profile (**Figure 2.1 (d)**) was characteristic of the Rabitteye cultivars Briteblue and Woodard. The acetylated anthocyanins have been suggested to be characteristic of wild blueberry species, the so-called Lowbush cultivars (Gao & Mazza, 1994 and 1995; Prior et al., 2001), and were not found in some Highbush cultivars like Bluecrop, Brigitta, Coville, Elliot or Rubel (Prior et al., 2001; Lohachoompol et al., 2008; Wang et al., 2012; Ma et al., 2013) and also in Rabitteye cultivars like Bluegem, Briteblue, Climax, Powderblue or Woodard (Lohachoompol et al., 2008; Wang et al., 2012). In addition, acetylated and other acylated anthocyanins were identified in wild Lowbush cultivars from the Canadian region of Québec (Nicoué et al., 2007). In contrast, some commercial and Highbush

blueberry cultivars, including the Bluecrop, have been found to contain acetylated anthocyanins (Cho et al., 2004; Borges et al., 2010; Yousef et al., 2013). Therefore, the occurrence of acylated anthocyanins as a characteristic marker for any blueberry species is not still a matter of consensus, but all the reported data for Rabbiteye cultivars suggest the absence of acylated anthocyanins in this blueberry species, as our results mainly support. However, traces of the acetylgalactosides of delphinidin and cyanidin were detected but their quantitation was not possible.

In the 2010/2011 harvest (**Table 2.3**), the concentration of anthocyanins ranged from 10.8–26.2 g malvidin 3-glucoside/kg DW, being the Rabbiteye cultivars Powderblue (Pb-2) and Bluegem (Bg-3) those having the highest concentration of anthocyanins in this harvest. These results were similar to others previously reported (Lohachoompol, Mulholland, Srzednicki & Craske, 2008; Pertuzatti et al., 2014), that analysed Rabbiteye and Highbush blueberries and found the highest concentration of anthocyanins in Powderblue (11.9 g cyanidin 3-glucoside/kg DW) and Climax cultivars (13.7 g cyanidin 3-glucoside/kg DW). The Bluecrop cultivar produced in Vacaria (Bc-2) had the lowest content of anthocyanins, not differing significantly at $p \leq 0.05$, from Elliot (E-4), Darrow (D-4) and Bluecrop (Bc-4), all belonged to Highbush species.

Table 2.3 Anthocyanin Profile (Molar Percentage of Each Anthocyanin) and Total Anthocyanin Content (g/kg DW, as Malvidin 3-Glucoside Equivalents) of Different Blueberries Cultivars from 2010/2011 Harvest.

Peak	Highbush cultivars						Rabitleye cultivars									
	Bc-2	Bc-4	D-4	E-1	E-2	E-4	Bg-2	Bg-3	Bb-3	C-2	C-3	F-2	F-3	Pb-2	Pb-3	W-3
1	18.06cd	13.36ef	19.09bc	14.05e	21.69a	17.35d	13.45ef	12.32fg	6.86k	12.05gh	10.38i	11.15hi	10.48i	19.8b	13.29ef	8.19j
2	1.52h	10.99a	7.84c	7.74c	0.28j	3.46g	4.90ef	4.80ef	8.13c	5.95d	5.08e	3.49g	4.52f	0.91i	1.37h	8.66b
3	2.12i	1.72ij	1.35j	1.87ij	2.91h	3.75g	9.47c	7.86d	4.49f	14.51a	11.66b	14.98a	9.20c	6.48e	4.69f	6.15e
4	10.92b	12.41a	12.80a	10.77b	12.92a	9.28c	7.05e	6.14fg	5.44h	7.14de	6.37f	6.65ef	6.20f	7.66d	5.55gh	6.36f
5	0.20i	1.42f	0.54h	0.90g	0.09i	0.14i	3.73e	3.67e	6.53c	7.27a	6.36c	4.66d	4.65d	0.62h	1.12g	6.84b
6	3.34f	1.86h	2.45g	2.03h	3.27f	2.64g	5.06d	4.84d	3.50f	7.04a	5.80c	6.56b	4.27e	6.03c	5.11d	4.23e
7	9.49a	5.30hi	6.98cd	5.78gh	9.82a	7.52c	6.99cd	6.69ef	5.01i	6.00g	6.66ef	6.31fg	7.08cd	8.32b	7.06cd	5.07i
8	1.36j	7.10c	5.20d	5.26d	0.26l	2.68i	4.41fg	4.73e	7.81a	4.54ef	4.80e	3.07h	4.21g	0.76k	1.59j	7.54b
9	0.27j	1.41c	1.03d	1.05d	ND	0.53i	0.88fg	0.94e	1.55a	0.90ef	0.96e	0.61h	0.84g	0.15k	ND	1.50b
10	0.98h	0.38j	0.34j	0.57i	1.02h	0.63i	2.52de	2.36ef	1.57g	2.96c	3.27b	4.07a	3.17b	2.68d	2.29f	1.74g
11	5.61a	4.08d	4.87c	4.11d	5.58a	5.19b	3.42e	3.34ef	3.30ef	2.83g	3.31ef	3.13f	3.31ef	3.98d	3.97d	3.24ef
12	0.52d	1.56a	1.62a	1.42b	ND	1.21c	ND	ND	NQ	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	NQ
13	NQ	NQ	NQ	NQ	0.19h	NQ	3.63e	3.75e	5.80a	4.99c	5.47b	4.64d	5.31b	0.93g	1.38f	5.38b
14	20.76c	6.64j	9.86h	10.20gh	26.84a	15.06d	11.72fg	13.52de	9.04hi	6.79j	9.19hi	10.14gh	12.06ef	23.89b	26.14a	7.93ij
15	5.52c	1.77j	2.62h	2.71gh	ND	4.00d	3.12fg	3.59de	2.40hi	1.81j	2.44hi	2.69gh	3.21ef	6.35b	6.95a	2.11ij
16	0.55h	0.31ij	0.23j	0.38i	0.52h	0.36i	0.94g	0.88g	1.17de	1.23cd	1.30bc	1.56a	1.35b	1.00fg	1.09ef	1.12de
17	2.80k	10.22f	7.22h	10.03f	1.01l	5.21i	10.84e	12.59c	19.09a	8.55g	10.32ef	8.27g	11.54d	2.88k	4.11j	16.86b
18	NQ	NQ	NQ	NQ	ND	NQ	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	NQ	NQ	ND
19	0.19h	0.84a	0.64b	0.64b	ND	0.37d	0.29efg	0.32e	0.51c	0.25g	0.27fg	0.20h	0.31ef	ND	0.14i	0.50c
20	14.12a	10.49ab	10.41ab	13.11a	13.55a	14.32a	7.08bc	7.13bc	6.87bc	4.76c	5.91bc	7.41bc	7.74bc	7.50bc	14.04a	5.81bc
21	NQ						ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22	0.09d	0.31bc	0.51a	0.27c	ND	0.33b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	NQ	ND	ND	0.24a	ND	ND	0.11e	0.12e	0.21b	0.13d	0.13d	0.11e	0.15c	ND	ND	0.16c
24	NQ	0.27a	0.15b	ND	ND	0.13c	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25	NQ						ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26	0.20h	0.89a	0.62d	0.84b	0.04j	0.50e	0.39f	0.42f	0.71c	0.27g	0.30g	0.28g	0.40f	ND	0.12i	0.61d
27	0.32e	1.93a	1.65b	1.48c	ND	1.13d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	0.43c	1.26b	1.87a	1.29b	ND	1.70a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
29	NQ	0.17b	0.09c	0.21a	ND	0.11c	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	0.61d	3.30a	2.76b	3.07a	ND	2.41c	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	10.8±0.7 h	14.6±1.6 efgh	12.8±2.3 fgh	17.9±2.7 cdef	19.8±2.9 bcd	12.6±2.0 gh	23.1±2.8 abc	23.6±1.2 ab	13.4±0.5 fgh	20.3±1.3 bcd	16.0±0.9 defg	19.5±1.3 bcde	16.7±0.8 defg	26.2±1.5 a	17.5±0.7 defg	14.1±0.4 fgh

* Anthocyanin Peaks like in Table 2.2. ND, not detected, NQ, detected but not quantifiable, Anthocyanins total = g malvidin 3-glucoside/kg DW

In the 2011/2012 harvest (**Table 2.4**), the concentration of anthocyanins ranged between 12.0 and 26.5 g of malvidin 3-glucoside/kg DW and the cultivars showing the highest levels of anthocyanins, Bluegem (Bg-2), Climax (C-2) and Florida (F-2), belonged to Rabbiteye species again, while the cultivars with lowest anthocyanin concentration were the Highbush cultivars Bluecrop (Bc-2), Elliot (E-4) and Coville (Co-2). When comparing different blueberry species, previous studies reported that Rabbiteye species contained higher concentration of anthocyanins than Highbush, Southern Highbush and Lowbush blueberries (Howard & Hager, 2007; Lohachoompol et al., 2008; Scalzo, Stevenson & Hedderley, 2013), although the earlier work of Prior et al. (1998) did not report on significant anthocyanin contents between Highbush and Rabbiteye cultivars of blueberry.

The anthocyanin content is fruit size dependent. Several studies have confirmed that smaller blueberries contain more anthocyanin per unit volume (Gao e Mazza, 1994; Moyer et al., 2002). Comparing the sizes and weights of blueberries (**Table 2.1**) with the anthocyanin concentrations found for each cultivar in both harvests (**Table 2.3** and **Table 2.4**) confirmed the latter observation. In both harvests, the Highbush cultivars had sizes and weights bigger than the Rabbiteye cultivars, being Bluecrop (Bc-2) the cultivar showing the largest berry (2.35 g) and the lowest anthocyanin content in the 2010/2011 harvest (10.8 g of malvidin 3-glucoside/kg DW), while Elliot (E-4) and Coville (Co-2) were the cultivars having the heaviest weights (2.02 g and 2.00 g, respectively) and the lowest anthocyanin contents in the 2011/2012 harvest (13.1 and 15.1 g of malvidin 3-glucoside/kg DW, respectively). The latter results are in agreement with the finding that pigments reside exclusively in the skin of the blueberry and for a given volume of fruit, the amount of the skin or the surface area increases as the berry size decreases (Moyer et al., 2002).

Table 2.4 Anthocyanin Profile (Molar Percentage of Each Anthocyanin) and Total Anthocyanin Content (g/kg DW, as Malvidin 3-Glucoside Equivalents) of Different Blueberries Cultivars from 2011/2012 Harvest.

Peak	Highbush cultivars				Rabitleye cultivars									
	Bc –2	Co – 2	E –2	E – 4	Bg –2	Bg – 3	Bb –3	C –2	C – 3	F –2	F – 3	Pb –2	Pb –3	W –3
1	11.91fg	22.27a	22.37a	19.68b	15.27d	11.45g	8.54i	11.37g	11.29g	12.63f	9.88h	14.07e	18.36c	9.23hi
2	7.16b	0.33j	0.34j	2.28h	5.22d	4.50e	7.33ab	5.73c	5.09d	4.38e	3.22g	3.67f	0.84i	7.56a
3	1.62j	2.60h	2.67h	2.04i	12.09e	7.81g	12.72d	12.64d	14.70b	14.88b	16.39a	14.27c	9.38f	12.14e
4	9.85c	11.05b	11.90a	11.69a	7.43d	6.09g	6.73ef	6.52f	6.89e	6.53f	5.80g	6.44f	6.95e	7.01e
5	0.88i	0.09j	0.09j	0.17j	4.42g	3.73h	9.83a	6.38d	7.20c	4.93f	5.47e	4.43g	0.88i	9.54b
6	1.97i	3.97h	3.63h	4.90fg	5.29f	4.69g	8.59a	5.83e	7.44c	5.84e	7.06cd	5.28f	6.71d	7.98b
7	5.61j	11.29a	10.32b	6.77fg	7.30e	6.48gh	4.30k	6.31hi	6.01ij	7.14ef	6.28hi	7.92d	9.27c	4.40k
8	5.35b	0.41k	0.32k	1.79i	4.21e	4.63c	6.45a	4.61c	4.38d	3.69f	3.30g	3.14h	1.14j	6.48a
9	1.07b	ND	ND	0.36i	0.84e	0.92c	1.28a	0.92c	0.87d	0.73f	0.66g	0.63h	ND	1.29a
10	0.58i	1.08g	0.99g	0.78h	2.46e	2.47e	2.07f	3.24c	3.26c	3.78b	4.26a	3.71b	2.74d	2.10f
11	4.04c	5.59a	5.55ab	5.42b	3.03e	3.32d	2.72g	2.76g	2.91ef	2.83fg	2.93ef	2.85fg	4.13c	2.84fg
12	1.37 ^a	0.46c	ND	0.78b	ND	ND	NQ	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	NQ
13	NQ	NQ	0.15h	NQ	3.47f	4.11e	5.53a	5.45ab	5.34bc	4.74d	5.22c	4.18e	0.97g	5.52a
14	11.76f	26.77b	27.50a	17.38d	9.92g	13.39e	5.16j	8.34h	7.42i	9.25g	9.87g	11.26f	20.69c	5.18j
15	3.13d	ND	ND	4.62b	2.64e	3.56c	1.37i	2.22g	1.97h	2.46f	2.62ef	2.99d	5.50a	1.38i
16	0.37g	0.53f	0.47fg	0.42g	0.85e	0.96d	1.08c	1.30b	1.21b	1.29b	1.50a	1.25b	0.86de	1.10c
17	11.62b	0.96i	1.11i	3.57g	9.10d	13.27a	11.94b	9.99c	8.50e	8.74de	8.90d	7.41f	2.80h	11.81b
18	NQ	ND	ND	NQ	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	NQ	NQ	ND
19	0.67 ^a	ND	ND	0.25de	0.26de	0.31c	0.39b	0.27cd	0.26d	0.23de	0.25de	0.22e	0.11f	0.40b
20	12.74b	12.61b	12.57b	13.47a	5.82e	7.76d	3.42h	5.67ef	4.88g	5.51f	5.96e	5.93e	8.60c	3.48h
21	NQ		ND											
22	0.24 ^a	ND	ND	0.18b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	NQ	ND	ND	ND	0.10e	0.12d	0.15a	0.15ab	0.12cd	0.13cd	0.14bc	0.10e	ND	0.16a
24	0.20 ^a	ND	ND	0.07b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25	NQ		ND											
26	1.01 ^a	ND	ND	0.31de	0.30de	0.43b	0.39c	0.33d	0.25f	0.30e	0.30de	0.23f	0.07g	0.40c
27	1.37 ^a	ND	ND	0.65b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	1.69 ^a	ND	ND	0.99b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
29	0.22 ^a	ND	ND	0.05b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	3.60 ^a	ND	ND	1.39b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	12.0±2.3 g	15.1±1.6 defg	17.3±0.4 cdef	13.1±1.5 fg	26.5±1.9 a	16.7±3.4 cdefg	13.2±0.4 fg	26.5±1.9 a	18.2±1.2 bcde	22.9±1.3 ab	15.8±1.1 cdefg	19.6±1.1 bcd	20.1±1.2 bc	14.3±0.9 efg

^a Anthocyanin Peaks like in **Table 2.2**. ND, not detected, NQ, detected but not quantifiable, Anthocyanins total = g malvidin 3-glucoside/kg DW

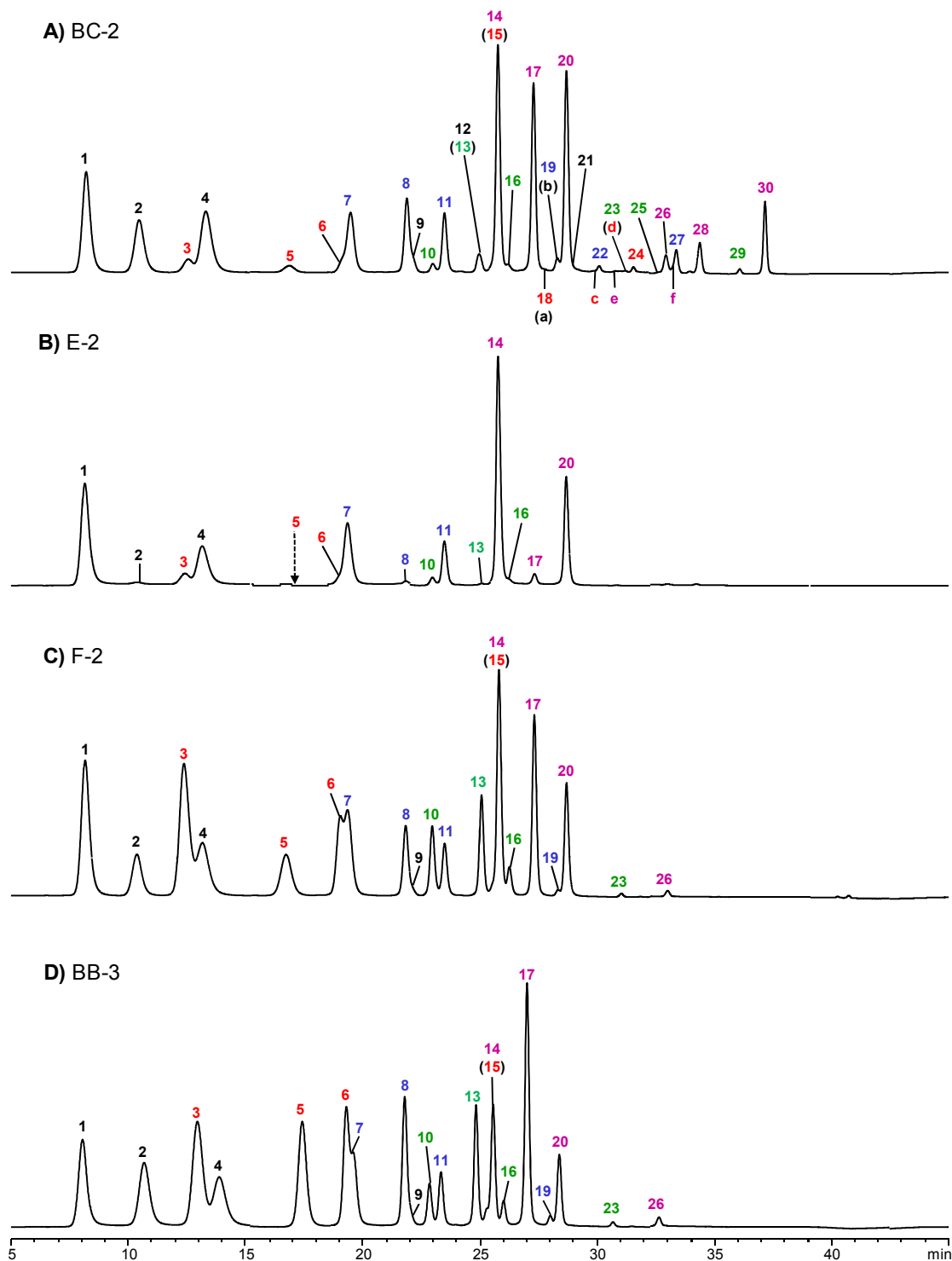


Figure 2.1 HPLC-chromatographic profile of anthocyanins present in four blueberry cultivars: a) Bluecrop Bc-2 2011/2012 harvest; b) Elliot E-2 2011/2012 harvest c) Florida F-2 2011/2012 harvest; d) Briteblue Bb-3 2011/2012 harvest. Peak in black = delphinidin-based anthocyanins, Peak in red = cyanidin-based anthocyanins, Peak in blue = petunidin-based anthocyanins, Peak in green = peonidin-based anthocyanins, Peak in purple = malvidin-based anthocyanins

The Principal Component Analysis (PCA) allows identify the main relationships between features extracted from the data. This analysis did not differentiate between samples according to the different producers or harvests. However, there was a separation of samples due to the kind of blueberry species, Rabbiteye or Highbush. The first Principal Component explained an accumulative variance of 47.4 %. The plot of blueberry samples in the plane defined by the PC-1 and PC-2 explained the 83.3 % of total variance. The grouping of cultivars on the scores plot showed that the separation was done according to the species of the blueberry cultivars (**Figure 2.2 (a)**). The Rabbiteye cultivars showed a high degree of overlapping and were found in the left side of the scores plot, while the Highbush cultivars were found in the opposite side. This can be explained by the fact that the cultivars belonging to Rabbiteye group stood out for high molar percentages of cyanidin 3-galactoside (peak 3), cyanidin 3-glucoside (peak 5), peonidin 3-galactoside (peak 10) and peonidin 3-arabinoside (peak 16) while Highbush cultivars showed higher molar percentages of delphinidin 3-arabinoside (peak 4), petunidin 3-arabinoside (peak 11) and malvidin 3-arabinoside (peak 20) (**Figure 2.2 (b)**). In addition, the occurrence of acetylated anthocyanins (**Figure 2.2 (b)**) contributed significantly to the better separation of some samples of Highbush cultivars which appeared in the right top section of the scores plot (**Figure 2.2 (a)**). Moreover, taking in consideration the four anthocyanin profiles observed for the studied blueberry cultivars, the PCA allowed a good grouping of practically all the samples according to these profiles (**Figure 2.2 (c)**) and also highlighted the similitude of the anthocyanin profile, namely profile B, shown by some of the Highbush and Rabbiteye cultivars. To our best knowledge, there have not been any studies using PCA to verify the differentiation between cultivars of Rabbiteye and Highbush blueberries based on their anthocyanin profiles. However, Moze et al. (2011) evaluated the levels of phenolic compounds

(phenolic acids, anthocyanins, flavanols, flavonols and stilbenes) in Slovenian bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) and reported on the differentiation among samples from different locations and attributed this separation to few anthocyanins: cyanidin 3-galactoside, cyanidin 3-arabinoside, cyanidin 3-glucoside and delphinidin 3-galactoside, some of which also caused the differentiation observed in our study.

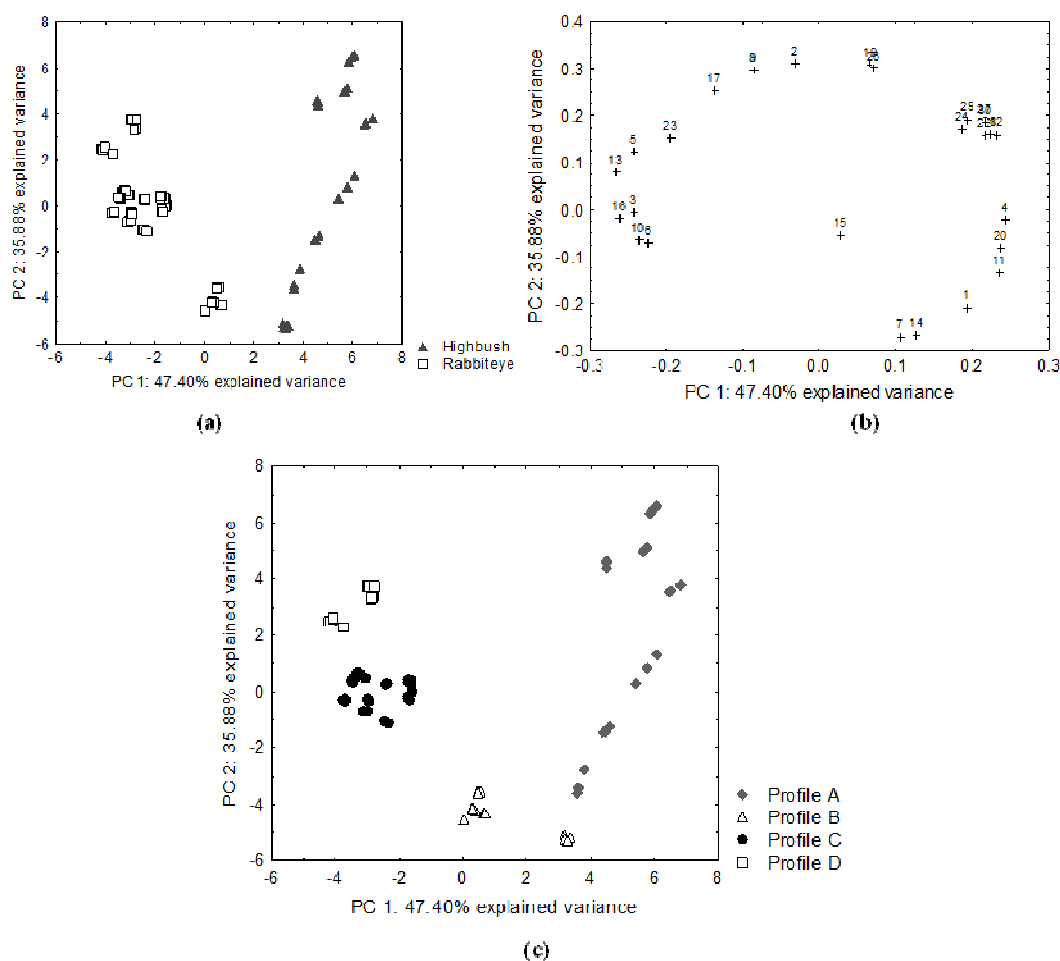


Figure 2.2 Principal component analysis (PCA) of blueberry cultivars. (a) Graph of scores for PC1 (factor 1) and PC2 (factor 2) showing Rabbiteye and Highbush separation, (b) Graph of loadings, (c) Graph of scores for PC1 (factor 1) and PC2 (factor 2) showing the separation to Profile A, B, C and D (Figure 2.1 (a), 2.1 (b), 2.1 (c) and 2.1 (d), respectively). Anthocyanin assignation (Table 2.2).

4 CONCLUSIONS

Thirty six anthocyanins were detected in the analysed blueberries, and the quantitation was possible for thirty of them. The main anthocyanins were usually the galactoside and glucoside derivatives of malvidin and delphinidin. Remarkable differences in the anthocyanin profiles and in the content of total anthocyanins were found, mainly according to the type of blueberry species, as could be confirmed by Principal Component Analysis, which is closely related to the berry size and the occurrence of acetylated anthocyanins in most Highbush cultivars.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), for financial support, and to Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) and Universidad Castilla-La Mancha (UCLM) for incentives to research.

6 REFERENCES

- Barcia, M. T., Jacques, A. C., Pertuzatti, P. B., & Zambiasi, R. C. (2010). Determination by HPLC of ascorbic acid and tocopherols in fruits. *Semina: Ciências Agrárias*, 31, 381-390.
- Barcia, M. T., Pertuzatti, P. B., Gómez-Alonso, S., Godoy, H. T., Hermosín-Gutiérrez. (2014). Phenolic composition of grape and winemaking by-products of brazilian hybrid cultivars BRS violeta and BRS lorena [Tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas.
- Borges, G., Degeneve, A., Mullen, W., & Crozier, A. (2010). Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3901-3909.
- Castillo-Muñoz, N., Fernández-González, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2009). Red-Color Related Phenolic Composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) Grapes and Red Wines. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 57, 7883–7891.
- Cho, M. J., Howard, L. R., Prior, R. L., & Clark, J. R. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry, and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1771-1782.
- Gao, L., & Mazza, G. (1994). Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics in blueberries. *Journal Food Science*, 59, 1057–1059.

- Gao, L., & Mazza, G. (1995). Characterization of acetylated anthocyanins in lowbush blueberries. *Journal of Liquid Chromatography*, 18(2), 245-259.
- Howard, L. R., & Hager, T. J. (2007). Berry fruit phytochemicals. In: ZHAO, Y. *Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion*; CRC PRESS, 2007.
- Hwang, S. J., Yoon, W. B., Lee, O., Cha, S. J., & Kim, J. D. (2014). Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chemistry*, 146, 71-77.
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M., & Metche, M. (1996). Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.). *Food Chemistry*, 55 (1), 35-40.
- Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P. H., & Torronen, A. R. (2007). Contents of Anthocyanins and Ellagitannins in Selected Foods Consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1612-1619.
- Lätti, A. K., Kainulainen, P. S., Hayirlioglu-Ayaz, S., Ayaz, F. A., & Riihinen, K. R. (2009). Characterization of Anthocyanins in Caucasian Blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L.) Native to Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5244–5249.
- Lohachoompol, V., Mulholland, M., Srzednicki, G., & Craske, J. (2008). Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. *Food Chemistry*, 111, 249-254.
- Ma, C., Dastmalchi, K., Flores, G., Wu, S., Pedraza-Peñalosa, P., Long, C., & Kennelly, E. J. (2013). Antioxidant and metabolite profiling of north American and neotropical blueberries using LC-TOF-MS and multivariate analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3548-3559.

- Moraes, J. O., Pertuzatti, P. B., Corrêa, F. V., & Salas-Mellado, M. M. (2007). Study of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) in the process of food products. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(suppl), 18-22.
- Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B. & Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 519-525.
- Moze, S., Polak, T., Gasperlin, L., Koron, D., Vanzo, A., Ulrih, N. P. & Abram, V. (2011). Phenolics in Slovenian bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6998-7004.
- Nicoué, E. E., Savard, S., & Belkacemi, K. (2007). Anthocyanins in Wild Blueberries of Quebec: Extraction and Identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5626-5635.
- Nixdorf, S. L., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2010). Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. *Analytica Chimica Acta*, 659, 208–215.
- Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Jacques, A. C., Vizzotto, M., Godoy, H. T., & Zambiasi, R. C. (2012). Quantification of several bioactive compounds and antioxidant activities of six cultivars of brazilian blueberry. *The Natural Products Journal*, 2, 188-195.
- Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Rodrigues, D., Cruz, P. N., Hermosín-Gutiérrez, I., Smith, R., & Godoy, H. T. (2014). Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. *Food Chemistry*, 164, 81-88.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., Mcewen, J., O'brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., & Mainland, C. M. (1998). Antioxidant

- Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2686-2693.
- Prior, R. L., Lazarus, S. A., Cao, G., Muccitelli, H., & Hammerstone, J. F. (2001). Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium Spp.*) using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1270-1276.
- Scalzo, J., Stevenson, D., & Hedderley, D. (2013). Blueberry estimated harvest from seven new cultivars: Fruit and anthocyanins. *Food Chemistry*, 139, 44-50.
- Sun, L., Ding, X., Qi, J., Yu, H., He, S., Zhang, J., Ge, H., & Yu, B. (2012). Antioxidant anthocyanins screening through spectrum–effect relationships and DPPH-HPLC-DAD analysis on nine cultivars of introduced rabbiteye blueberry in China. *Food Chemistry*, 132, 759-765.
- Wang, S. Y., Chen, C., Sciarappa, W., Wang, C. Y., & Camp, M. J. (2008). Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5788-5794.
- Wang, S. Y., Chen, H., Camp, M. J. & Ehlenfeldt, M. K. (2012). Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of Rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). *Food Chemistry*, 132, 855-864.
- Wu, X., & Prior, R. L. (2005). 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*, 53, 2589-2599.
- Yousef, G. G., Brown, A. F., Funakoshi, Y., Mbeunkui, F., Grace, M. H, Ballington, J. R., Loraine, A., Lila, M. A. (2013). Efficient quantification of the health-relevant

anthocyanin and phenolic acid profiles in commercial cultivars and breeding selections of blueberries (*Vaccinium* spp.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 4806-4815.

ARTIGO 3

Determinação de compostos fenólicos não antociânicos por HPLC-DAD-ESI-MSⁿ e aplicação de análise de componentes principais para classificação de mirtilos Rabbiteye e Highbush

Determinação de compostos fenólicos não antociânicos por HPLC-DAD-ESI-MSⁿ e aplicação de análise de components principais para classificação de mirtilos Rabbiteye e Highbush

Paula Becker Pertuzatti^{a,b,*}, Milene Teixeira Barcia^a, Ligia Portugal Gomes Rebello^c,
Sérgio Gómez-Alonso^{d,e}, Isidro Hermosín-Gutiérrez^d, Helena Teixeira Godoy^a

^a Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato 80, 13083-862 Campinas, Brazil

^b Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de Mato Grosso, Avenida Governador Jaime Campos 6.390, 78600-000 Barra do Garças, Brazil

^c Instituto Federal Fluminense, Avenida Dário Vieira Borges 235, 28360-000 Bom Jesus do Itabapoana, Brazil

^d Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Universidad de Castilla-La Mancha, Ronda de Calatrava 7, 13071 Ciudad Real, Spain

^e Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Paseo de la Innovación, 1, 02006, Albacete, Spain.

* Corresponding author. Tel.: +55 (66) 34057203; fax: +55 (66) 34021110

Email adress: paulapertuzatti@yahoo.com.br (P. Pertuzatti).

RESUMO

O mirtilo é uma fruta largamente estudada. No entanto, poucas informações existem sobre sua composição e o conteúdo de flavonóis glicosilados, devido as dificuldades de separação e identificação, a maioria dos trabalhos científicos, identifica apenas poucos flavonóis nesta fruta. No entanto, no presente estudo foram identificados 44 flavonóis e um ácido hidroxicinâmico, o ácido clorogênico, em 30 amostras de duas espécies de mirtilo, Highbush e Rabbiteye, pertencentes a quatro produtores comerciais da fruta, em duas safras, 2010/2011 e 2011/2012, utilizando HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. Observou-se que os frutos da espécie Highbush apresentam majoritariamente quercetina 3-galactosídeo, enquanto os frutos da espécie Rabbiteye apresentam em maior quantidade quercetina 3-rhamnosídeo e quercetina 3-glucuronídeo. Dentre os flavonóis identificados, foram encontrados 14 acilados (acetil, rhamnosil e hidroximetilglutaroil) e destes encontrou-se quercetin-3-O-[4''-(3-hidroxi-3-metilglutaroil)]- α -rhamnose, pela primeira vez em mirtilos, sendo este composto exclusivo das cultivares Florida e Powderblue, onde é encontrado como um dos flavonóis majoritários. Além deste composto, derivados da isorhamnetina, siringetina e laricitrina, foram encontrados pela primeira vez no mirtilo. A análise de componentes principais, mostrou que o perfil de compostos fenólicos pode ser usado para distinguir as espécies de mirtilo.

Palavras-chaves: *Vaccinium ashei* Reade, *Vaccinium corymbosum* L., flavonóis acilados, ácido clorogênico, análise de componentes principais

1 INTRODUÇÃO

As pequenas frutas cultivadas nas regiões de clima temperado tem despertado cada vez mais o interesse dos consumidores e dos produtores. Com um constante avanço na produção mundial, o cultivo de frutas como framboesa, amora, mirtilo e morango vem ganhando espaço em diversos países. Segundo Strik [1] em 2005, havia mais de 1,8 milhões de hectares de lavouras de pequenas frutas em todo mundo, produzindo 6,3 milhões de toneladas de frutas. Dentre as pequenas frutas uma das mais consumidas é o mirtilo, que segundo dados da Food and Agricultural Organization [2] apresentou uma produção de mais de 312 mil toneladas de frutas no mundo em 2010.

O Brasil possui uma condição climática privilegiada para tais culturas por apresentar regiões de clima temperado em quatro estados brasileiros, incluindo o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo. Dessa forma, o país apresenta potencial de produção durante quase todo o ano. Além disso, outro aspecto economicamente relevante é que a produção brasileira dessas frutas ocorre de dezembro a fevereiro, período de entressafra dos Estados Unidos e União Européia, os principais centros consumidores.

Devido ao crescente aumento na produção e consumo mundial de mirtilo, muitas investigações científicas sobre as propriedades desta fruta já foram e continuam sendo desenvolvidas. Uma atenção especial começou a ser dada ao mirtilo a partir do trabalho de Prior [3], onde constatou-se que esta fruta possuía a maior capacidade antioxidante pelo método de ORAC, quando comparada com outras 42 frutas e hortaliças.

Uma fração de compostos fenólicos, os flavonoides, são potentes antioxidantes *in vitro* [4] e incluem compostos como os flavonóis, flavanóis e antocianinas, encontrados em elevadas quantidades no mirtilo [5,6]. No entanto, muitas cultivares e espécies desta fruta existem e o seu teor de compostos fenólicos pode variar muito em

função das características de cada cultivar, das condições climáticas, do cultivo e das técnicas analíticas empregadas. Em função disto, e da crescente expansão do cultivo do mirtilo no Brasil, se torna importante a caracterização dos compostos fenólicos não antociânicos, como flavonóis e ácidos hidroxicinâmicos, com a ajuda da técnica HPLC-DAD-ESI-MSⁿ e a avaliação do conteúdo de diferentes espécies e cultivares de mirtilo produzidas no Brasil.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Os solventes utilizados foram de grau HPLC, os demais reagentes foram de grau analítico (>99%) e a água utilizada foi de qualidade Milli-Q. Todos os padrões foram utilizados para a identificação e quantificação dos flavonóis, através de curvas de calibração que abrangiam as concentrações esperadas. Quando não houve disponibilidade de algum padrão, a quantificação foi feita através da curva de calibração do composto com maior similaridade: quercetina 3-glicosídeo (Extrasynthese, Genay, França) foi utilizada para os flavonóis e ácido clorogênico (Extrasynthese, Genay, França) para a quantificação do mesmo.

2.2 Amostras

Foram utilizadas trinta amostras, pertencentes a dez cultivares de mirtilo, de duas safras: 2010/2011 e 2011/2012. As cultivares foram fornecidas por quatro produtores de três diferentes cidades do Rio Grande do Sul – Brasil e estão dispostas na

Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Cultivares, espécies e produtores dos mirtilos analisados, com suas respectivas cidades

Cultivar	Espécie	Produtor	Cidade
Elliot	Highbush	1	Campestre da Serra (28° 47' S, 51° 05' W)
Florida	Rabbiteye	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Bluecrop	Highbush	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Elliot	Highbush	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Climax	Rabbiteye	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Powderblue	Rabbiteye	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Bluegem	Rabbiteye	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Coville	Highbush	2	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Powderblue	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)
Briteblue	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)
Woodard	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)
Florida	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)
Climax	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)
Bluegem	Rabbiteye	3	Erechim (27° 38' S, 52° 16' W)
Elliot	Highbush	4	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Darrow	Highbush	4	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)
Bluecrop	Highbush	4	Vacaria (28° 30' S, 50° 56' W)

As frutas foram cortadas ao meio, congeladas e liofilizadas (liofilizador Terroni, modelo LS-3000E, São Paulo, Brasil), adicionou-se nitrogênio líquido e triturou-se as amostras, que foram armazenadas em embalagens metálicas, fechadas a vácuo e congeladas a -20 °C durante a realização das análises.

2.3 Preparo dos extratos para análise de compostos fenólicos

Uma porção de 0,5 g de amostra liofilizada foi extraída com 25 mL de uma mistura de metanol:água:ácido fórmico (50:48,5:1,5 v/v), após a amostra foi submetida a ultrassom por dois minutos e em seguida centrifugada por cinco minutos a 5 °C e 6000 g e filtrada. Em seguida a amostra foi re-extraída por mais duas vezes, deste modo, obteve-se a extração de 99% do conteúdo de compostos fenólicos, o que foi confirmado através da análise cromatográfica de seis extrações sucessivas.

Após a obtenção dos extratos, foi realizada a extração em fase sólida. Para isto, utilizou-se cartuchos Bond Elut Plexa PCX (Agilent Technologies, USA; cartuchos de 6 cm³ com 500 mg de adsorvente) contendo uma mistura de materiais de troca catiônica

que permitem isolar os flavonóis presentes no mirtilo. Para possibilitar a separação, foi necessário retirar o metanol do extrato bruto, para isso 3 mL da amostra foram secos em rotaevaporador (40°C) (Laborota 4002-Control, Heidolph) e ressuspensos em 3 mL de ácido clorídrico 0.1 mol L⁻¹. O procedimento de preparo das amostras foi anteriormente desenvolvido em nosso laboratório [7] e compreende as seguintes etapas:

Limpeza da amostra: Em condições ácidas, as antocianinas encontram-se na forma de íons flavilium (em 3 mL de amostra), em função disto, podem ser retidas por troca iônica quando passam pelo cartucho PCX, previamente condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água. Nesta etapa, o fluxo é controlado para garantir a retenção de todos compostos fenólicos, os quais possuem polaridade intermediária. Procede-se lavando o cartucho com 5 mL de ácido clorídrico 0.1 mol L⁻¹ e 5 mL de água.

Extração: A fração de flavonóis e ácidos fenólicos, foi eluída com 3×5 mL de MeOH. Esta fração também continha outros polifenóis, neutros ou ácidos (flavan-3-óis ou taninos e derivados de ácidos hidroxicinâmicos, respectivamente). Após eluído, o extrato foi seco em rotaevaporador (40 °C) e ressuspensado em 1mL de uma solução de metanol 20% em água ultra-pura (v/v) .

Regeneração do cartucho: As antocianinas fixadas foram removidas e descartadas, usando 3×5 mL de NH₄OH 2% em MeOH 80%, e o material de troca catiônica foi regenerado com 3×5 mL de HCl 2% em MeOH 80%.

Após a extração, os extratos de flavonóis, isentos de antocianinas, foram armazenados em frasco âmbar a uma temperatura de -18°C até o momento da análise.

2.4 Determinação de compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI-MSⁿ

A separação, identificação e quantificação cromatográfica dos compostos fenólicos foi realizada em um cromatógrafo Agilent 1100 Series system (Agilent, Alemanha), equipado com detector DAD (G1315B) e um analisador *ion trap* no espectrômetro de massas LC/MSD Trap VL (G2445C VL) além de *electrospray* como

fonte de ionização (ESI-MSⁿ), utilizando como processador de dados cromatográficos o software Agilent ChemStation (version B.01.03) já os espectros de massa foram processados em um software Agilent LC/MS Trap (version 5.3).

Foram injetados 20 µL dos extratos de compostos fenólicos, em uma coluna de fase reversa (Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1x150mm; 3,5 µm partícula; Agilent, Alemanha)), a 40 °C. Foi utilizada uma fase móvel composta por três soluções; A solução A continha acetonitrila/água/ácido fórmico nas proporções de 3:88,5:8,5, (v/v/v), respectivamente, na solução B foram utilizados os mesmos solventes nas proporções 50:4,5:8,5, (v/v/v), respectivamente, e no solvente C foi utilizado metanol/água/ácido fórmico, 90:1,5:8,5, (v/v/v). O fluxo utilizado foi 0,19 mL/min. Utilizou-se também o seguinte sistema de gradiente linear: 0 min, 98% A, e 2% B; 8 min, 96% A, e 4% B; 37 min, 70% A, 17% B, e 13% C; 51 min, 50% A, 30% B, e 20% C; 51,5 min, 30% A, 40% B, e 30% C; 56 min, 50% B, e 50% C; 57 min, 50% B, e 50% C; 64 min, 98% A, e 2% B.

Para identificação, ESI-MSⁿ foi utilizado, empregando os seguintes parâmetros: modo de ionização negativa; gás secante, N₂, 11 mL/min; temperatura, 350°C; nebulização, 65 psi; voltagem do capilar, -2500 V; saída do capilar, 70 V; skimmer 1, 20 V; skimmer 2, 6 V; estabilidade dos compostos, 100%; intervalo de varredura, 50-1200 m/z. Para quantificação, os cromatogramas DAD foram extraídos a 360 nm (flavonóis), e 320 nm (ácido clorogênico), e a concentração dos compostos foi expressa em equivalentes de quercetina 3-glucosídeo (flavonóis), e ácido clorogênico.

2.5 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando ANOVA e teste de Tukey, focando na diferença significativa das médias. O software Statistic 7.0 foi empregado e o nível de significância da diferença das médias foi 5% ($p < 0,05$). Foi também utilizada a

ferramenta de análise de componentes principais (PCA), programa Pirouette 3.11. Os dados foram previamente auto-escalados, antes de serem submetidos a análise de componentes principais. Todas as análises foram feitas em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição de compostos fenólicos

Os dados da análise cromatográfica dos extratos de mirtilo, como tempo de retenção, identificação dos picos e espectro de absorção UV-vis, estão apresentados na **Tabela 3.2**, assim como íon precursor e íon produto.

Determinação de compostos fenólicos não antociânicos por HPLC-DAD-ESI-MSⁿ...

Tabela 3.2 Tempo de retenção e dados espectrais dos flavonóis e ácido clorogênico identificados em mirtilos

pico	Compostos fenólicos	HPLC t _R (min)	máximoUV-vis (nm)	MS	MS/MS
1	myricetin 3-glucuronide	17.3	256sh, 261, 305sh, 355	493	317
2	myricetin 3-galactoside	17.7	256sh, 261, 305sh, 356	479	317
3	myricetin 3-(6''-rhamnosyl)galactoside	18.3	ND	625	-
4	myricetin 3-glucoside	18.9	256sh, 261, 305sh, 356	479	317
5	myricetin 3-(6''-rhamnosyl)glucoside	19.6	ND	625	-
6	myricetin 3-pentoside	22.2	354	449	317
7	myricetin 3-rhamnoside	22.4	255sh, 262, 302sh, 349	463	317
8	myricetin 3-pentoside	23.7	256sh, 261, 305sh, 356	449	317
9	quercetin 3-galactoside	25.4	256, 265sh, 305sh, 354	463	301
10	quercetin 3-glucuronide	25.8	256, 265sh, 305sh, 354	477	301
11	quercetin 3-(6''-rhamnosyl)galactoside	26.8	256, 265sh, 302sh, 350	609	(463)-301
12	quercetin 3-glucoside	27.3	256, 265sh, 305sh, 353	463	301
13	quercetin 3-(6''-rhamnosyl)glucoside	28.0	256, 265sh, 302sh, 350	609	(463)-301
14	quercetin 3-pentoside	28.2	256, 265sh, 305sh, 356	433	301
15	laricitrin 3-galactoside	29.4	257, 265sh, 305sh, 356	493	331
16	quercetin 3-(6''-acetyl)galactoside	29.4	256, 265sh, 304sh, 356	505	463-(445)-(343)-301
17	quercetin 3-pentoside	29.8	256, 265sh, 305sh, 356	433	301
18	quercetin 3-(6''-acetyl)galactoside	30.0	256, 265sh, 304sh, 356	505	463-(445)-(343)-301
19	laricitrin 3-glucuronide	30.0	255, 265sh, 305sh, 358	507	331
20	laricitrin 3-glucoside	30.3	ND	493	331
21	quercetin 3-pentoside	30.6	256, 265sh, 302sh, 352	433	301
22	quercetin 3-rhamnoside	32.3	256, 265sh, 302sh, 348	447	301
23	kaempferol 3-galactoside	33.7	346	447	285
24	quercetin 3-(6''-acetyl)glucoside	34.2	256, 265sh, 300sh, 354	505	463-(445)-(343)-301
25	laricitrin 3-rhamnoside	35.4	255, 265sh, 302sh, 351	477	331
26	isorhamnetin 3-galactoside	35.4	255, 265sh, 302sh, 351	477	315
27	isorhamnetin 3-(6''-rhamnosyl)galactoside	35.9	256, 263sh, 300sh, 354	623	315
28	quercetin 3-(6''-acetyl)glucoside	36.1	256, 265sh, 300sh, 356	505	463-(445)-(343)-301
29	isorhamnetin 3-glucoside	37.0	256, 265sh, 305sh, 353	447	315
30	isorhamnetin 3-(6''-rhamnosyl)glucoside	37.5	255, 265sh, 300sh, 353	623	315
31	syringetin 3-galactoside	38.2	256, 263sh, 305sh, 355	507	345
32	syringetin 3-glucoside	38.9	355	507	345
33	syringetin 3-glucuronide	39.5	256, 263sh, 305sh, 357	521	345
34	Quercetin-free	40.8	256, 265sh, 295sh, 325sh, 372	301	301
35	isorhamnetin 3-(6''-acetyl)hexoside	41.1	ND	519	(357)-315
36	syringetin 3-pentoside	42.4	ND	477	345
37	quercetin-3-O-[4'-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)]-α-rhamnose	43.8	256, 265sh, 305sh, 348	591	529-489-447-(301)
38	syringetin 3-rhamnoside	44.6	256, 265sh, 303sh, 347	491	345
39	syringetin 3-pentoside	44.9	ND	477	345
40	isorhamnetin 3-(6''-acetyl)hexoside	45.3	354	519	(357)-315
41	Laricitrin-free	45.5	372	331	331
42	syringetin 3-(6''-acetyl)hexoside	46.3	ND	549	345
43	Isorhamnetin-free	54	371	315	315
44	Syringetin-free	55.7	372	345	345
1*	chlorogenic acid	5.8		353	191

ND= Não Detectado.

Cromatogramas obtidos para diferentes cultivares de mirtilo Highbush e Rabbiteye, demonstrando a separação dos flavonóis individuais estão apresentados na **Figura 3.1** e **3.2** (os picos identificados, estão numerados de 1 a 44 correspondendo aos compostos apresentados na **Tabela 3.2**).

Todas as cultivares de mirtilo, pertencentes as duas safras analisadas, apresentaram ácido clorogênico em grandes quantidades, o que confere com dados obtidos por outros autores [8,9] e por ser o principal ácido fenólico, encontrado no mirtilo, muitas das suas propriedades antioxidantes são atribuídas a este derivado do ácido cafeico [10]. Segundo alguns autores [11], tem sido muito estudado os benefícios a saúde devido ao consumo de ácido clorogênico e estudos epidemiológicos [12] tem mostrado uma correlação entre o consumo de café, rico em ácido clorogênico, e a redução de algumas doenças, como Alzheimer e diabetes.

Na safra de 2010/2011 (**Tabela 3.3**), houve uma variação entre 0,9–4,0 g ácido clorogênico/kg fruta seca, enquanto na safra de 2011/2012 (**Tabela 3.4**) a variação foi entre 0,2–3,1 g ácido clorogênico/kg fruta seca, a maioria das cultivares apresentou um teor maior de ácido clorogênico na safra de 2010/2011 do que na safra de 2011/2012 a $p \leq 0,05$, o que pode ser atribuído a uma maior incidência de radiação ultravioleta nas cidades produtoras de mirtilo, de outubro de 2010 a janeiro de 2011 [13], quando comparado com o mesmo período na safra posterior, período de produção das frutas no Brasil.

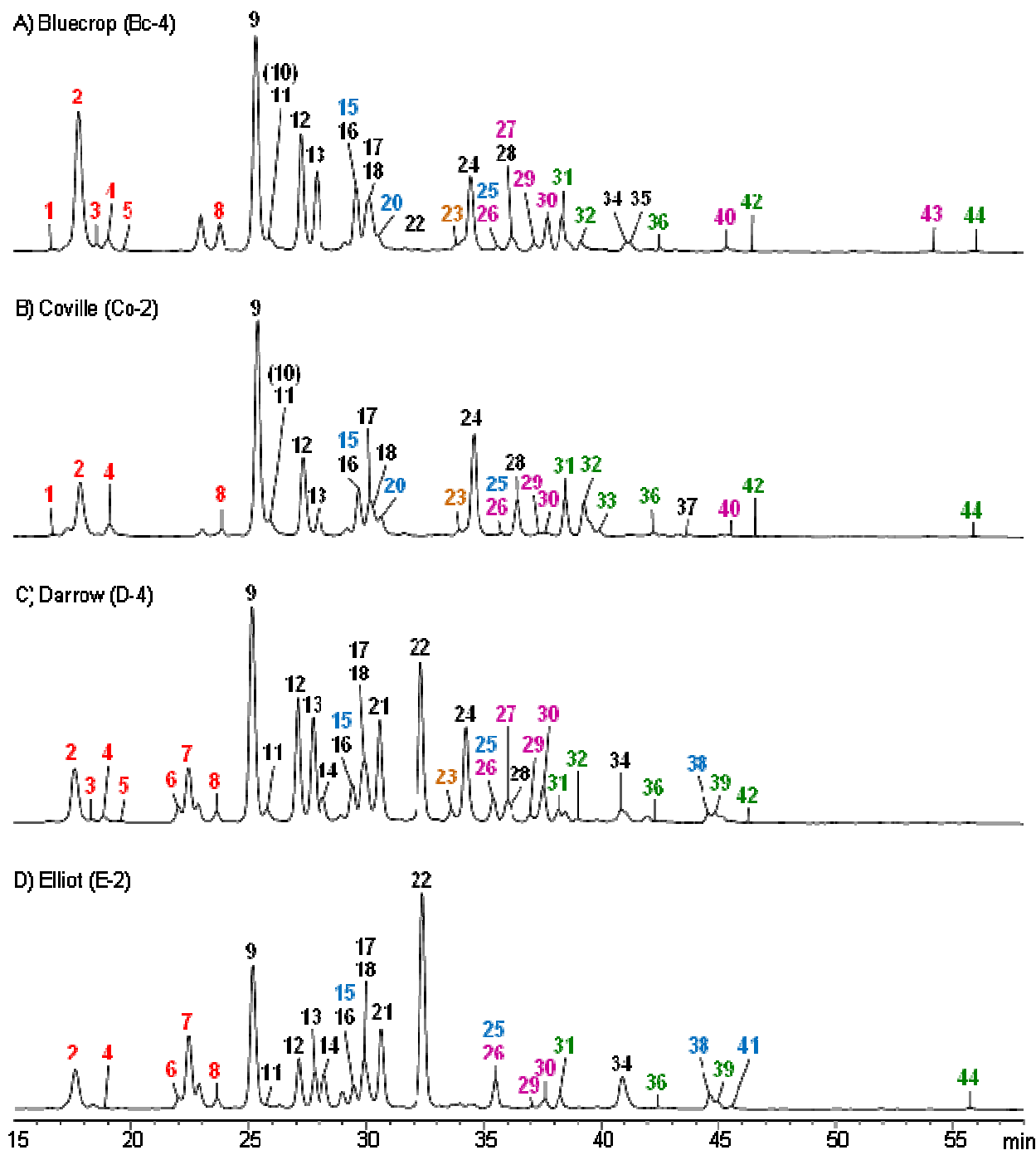


Figura 3.1 Perfil cromatográfico de flavonóis presentes em quatro cultivares de mirtilo Highbush produzidos em Vacaria: a) Bluecrop (Bc-4); b) Coville (Co-2); c) Darrow (D-4); d) Elliot (E-2); Os picos estão numerados de acordo com a tabela 2; Picos com números em vermelho são derivados da miricetina; Picos em preto são derivados da quercetina; Picos em azul são derivados da laricitrina; Picos em verde são derivados da sirringetina; Picos em roxo são derivados da isorhamnetina; Pico em laranja derivado do Kaempferol.

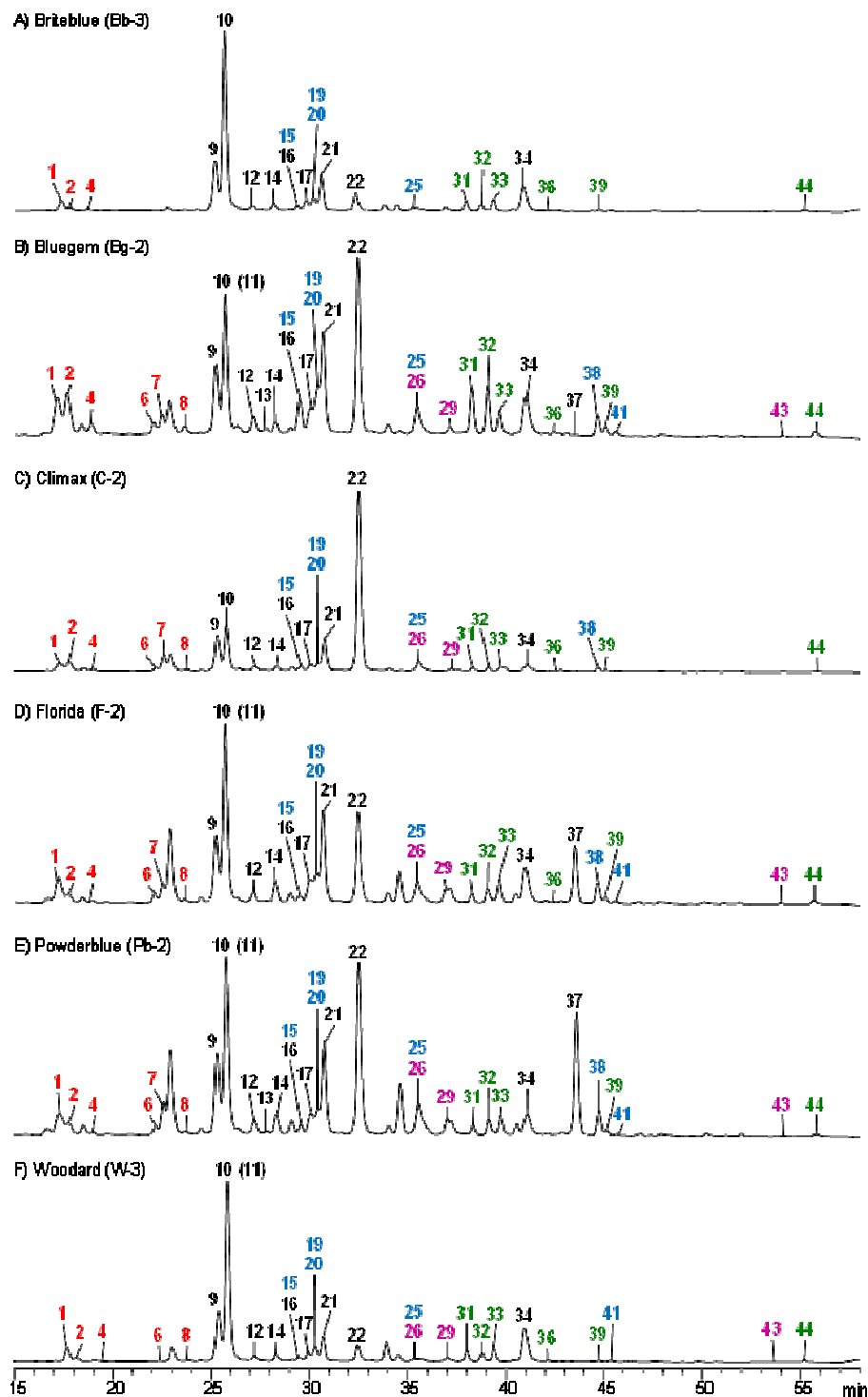


Figura 3.2 Perfil cromatográfico de flavonóis presentes em seis cultivares de mirtilo Rabbiteye: a) Briteblue (Bb-3); b) Bluegem (Bg-2); c) Climax (C-3); d) Florida (F-2); e) Powderblue (Pb-2); f) Woodard (W-3); Os picos estão numerados de acordo com a tabela 2; Picos com números em vermelho são derivados da miricetina; Picos em preto são derivados da quercetina; Picos em azul são derivados da laricitrina; Picos em verde são derivados da siringetina; Picos em roxo são derivados da isorhamnetina.

Determinação de compostos fenólicos não antociânicos por HPLC-DAD-ESI-MSⁿ...

Tabela 3.3 Perfil de flavonóis (Porcentagem molar de cada flavonol individual) e conteúdo total de flavonóis (g/kg FS, como equivalente de quercetina 3-glicosídeo) e ácido clorogênico (g/kg FS, como equivalente de ácido clorogênico) de diferentes cultivares de mirtilo pertencentes a safra de 2010/2011.

(continua)

Pico*	Cultivares Highbush						Cultivares Rabitteye									
	Bc-2	Bc-4	D-4	E-1	E-2	E-4	Bg-2	Bg-3	Bb-3	C-2	C-3	F-2	F-3	Pb-2	Pb-3	W-3
1	0.22 g	0.32 g	0.12 g	ND	ND	0.13 g	4.82 ab	4.29 c	4.44 bc	2.59 d	2.63 d	4.87 a	4.12 c	0.91 f	1.46 e	1.19 ef
2	7.91 c	17.80 a	5.56 d	9.26 b	5.83 d	5.11 d	5.37 d	5.64 d	1.35 gh	2.84 f	2.09 fg	0.69 h	1.82 g	5.05 de	4.09 e	0.44 h
4	1.21 ab	1.44 a	0.36 ef	0.40 e	0.38 ef	0.34 ef	1.03 bcd	1.21 ab	1.15 abc	0.72 de	0.66 de	ND	0.69 de	0.86 bcd	0.79 cd	ND
6	0.33 c	ND	0.99 ab	0.15 cd	1.11 a	0.85 ab	1.00 ab	1.12 a	0.26 cd	0.71 b	ND	0.86 ab	1.10 a	0.08 cd	ND	ND
7	4.87 bc	4.61 bcd	4.71 bcd	0.89 ef	9.15 a	5.10 bc	1.81 ef	5.27 bc	2.60 de	4.11 cd	5.52 bc	1.50 ef	6.21 bc	9.71 a	6.72 b	ND
8	0.79 cd	ND	0.72 cd	1.14 c	2.50 b	0.77 cd	4.32 a	0.45 cd	0.56 cd	4.27 a	0.14 d	ND	ND	0.23 cd	ND	ND
9	27.59 b	2.50 i	17.54 d	37.26 a	15.71 d	23.27 c	6.96 fg	5.62 gh	5.55 gh	8.67 f	5.25 gh	7.27 fg	3.60 hi	11.74 e	6.36 fg	2.69 i
10	0.88 d	22.25 b	ND	1.77 d	ND	0.80 d	13.27 c	13.85 c	33.53 a	10.90 c	11.80 c	22.95 b	19.46 b	4.75 d	5.28 d	10.69 c
11	ND	ND	0.98 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	8.85 b	1.16 ef	9.69 ab	10.05 a	5.52 d	7.76 c	1.37 ef	0.83 fg	0.81 fg	1.12 f	0.94 fg	1.10 f	0.50 fg	2.03 e	1.16 ef	0.20 g
13	3.68 d	10.88 a	8.05 b	7.39 b	3.64 d	6.57 c	0.21 f	0.20 f	0.22 f	ND	ND	ND	ND	1.04 e	0.21 f	ND
14	1.08 d	ND	1.65 c	0.16 e	3.34 a	2.00 bc	0.81 d	0.89 d	0.95 d	0.87 d	0.74 d	2.16 b	1.67 c	0.34 e	ND	0.34 e
15	4.51 b	7.10 a	2.84 de	4.61 b	2.16 f	2.18 f	3.28 cd	2.68 ef	1.55 g	0.98 hi	1.47 gh	0.58 ij	0.52 ij	2.59 ef	3.61 c	0.41 j
17	4.45 e	6.01 cd	6.99 b	8.47 a	6.44 bc	5.70 d	2.82 f	0.45 h	0.90 h	1.68 g	0.58 h	2.68 f	0.64 h	1.51 g	0.72 h	0.49 h
19	2.89 de	7.03 a	ND	0.53 f	ND	1.73 ef	4.10 cd	6.18 ab	6.40 ab	1.51 f	3.89 d	3.23 d	5.80 ab	3.25 d	5.26 bc	1.29 f
21	3.44 efg	1.50 fg	7.09 cd	0.72 g	8.90 abc	8.11 bc	9.44 abc	10.05 ab	5.02 de	7.66 bcd	3.89 ef	11.33 a	9.83 abc	1.96 fg	1.48 fg	2.37 efg
22	7.31 j	ND	11.85 h	0.70 l	23.47 c	15.09 fg	16.58 f	18.39 e	2.67 k	42.92 a	40.85 b	13.79 g	9.83 i	21.78 d	19.74 e	0.88 l
23	NQ	0.70 b	0.86 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	6.66 ab	7.22 a	7.56 a	7.10 a	ND	3.84 b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25	1.46 fg	1.11 gh	1.63 fg	0.46 hi	2.96 bc	2.08 def	2.96 bc	2.41 cde	0.67 hi	1.99 ef	2.75 bc	0.75 hi	2.67 bcd	3.21 b	4.54 a	0.17i
27	ND	ND	1.45 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	1.70 a	ND	0.54 b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
29	0.64 cde	2.94 a	0.55 de	2.41 b	ND	0.70 cd	0.56 de	0.54 e	0.76 c	0.29 f	0.63 cde	ND	2.41 b	0.30 f	0.25 f	ND
30	ND	ND	2.98 a	2.91 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
31	2.29 ef	3.38 de	0.86 g	2.30 ef	1.24 fg	1.67 fg	3.81 cd	4.81 bc	5.80 b	0.70 g	1.66 fg	0.77 g	1.30 fg	3.32 de	7.42 a	1.00 g
32	2.71 de	0.48 ghi	0.16 hi	0.37 ghi	0.07 i	0.40 ghi	4.18 c	4.73 bc	4.89 b	0.85 g	1.88 f	1.97 f	3.14 d	2.30 ef	5.94 a	0.75 gh
33	0.67 gh	ND	ND	ND	4.58 b	ND	1.87 de	2.44 cd	5.94 a	1.48 efg	2.58 cd	3.37 c	5.04 ab	0.53 h	1.67 def	0.91 fgh

Tabela 3.3 Perfil de flavonóis (Porcentagem molar de cada flavonol individual) e conteúdo total de flavonóis (g/kg FS, como equivalente de quercetina 3-glicosídeo) e ácido clorogênico (g/kg FS, como equivalente de ácido clorogênico) de diferentes cultivares de mirtilo pertencentes a safra de 2010/2011.

(continuação)

34	2.02 cd	1.57 cd	3.34 bcd	ND	1.63 cd	0.74 d	5.71 abc	3.84 abcd	7.39 ab	1.98 cd	7.81 a	5.34 abc	2.64 cd	1.61 cd	2.31 cd	1.48 cd
37	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.80 c	6.06 c	17.19 a	15.17 b	ND
38	0.83 d	ND	0.65 de	0.12 f	0.94 d	1.03 d	1.77 c	2.19 c	0.25 ef	0.79 d	1.76 c	2.93 b	4.47 a	3.02 b	4.36 a	ND
39	0.68 b	ND	0.26 c	0.13 c	0.26 c	0.70 b	0.71 b	0.97 a	0.59 b	0.26 c	ND	0.66 b	1.09 a	0.07 c	ND	ND
41	0.15 de	ND	ND	ND	ND	ND	0.43 b	0.28 c	0.65 a	0.11 de	ND	0.20 cd	ND	0.03 e	0.65 a	ND
44	0.19 c	ND	ND	ND	ND	ND	0.54 bc	0.42 bc	1.19 a	ND	0.48 bc	0.41 bc	ND	0.24 c	0.82 ab	ND
Conteúdo Total	0.9±0.0 bcd	1.4±0.1 bc	1.7±0.1 b	2.7±0.4 a	1.5±0.3 b	1.5±0.2 b	0.6±0.1 d	0.6±0.1 cd	0.7±0.04 cd	0.9±0.1 bcd	0.5±0.04 d	0.6±0.03 d	0.4±0.04 d	0.5±0.08 d	0.5±0.1 d	2.7±0.3 a
AC#	0.9±0.07 f	3.4±0.3 ab	3.0±0.1 bc	4.0±0.1 a	2.0±0.1 de	1.7±0.1 de	1.3±0.1 ef	1.5±0.1 ef	1.5±0.12 ef	2.5±0.21 cd	1.6±0.13 e	3.5±0.3 ab	2.0±0.1 de	1.4±0.1 ef	0.9±0.04 f	1.6±0.0 ef

* A identificação dos flavonóis está na **Tabela 3.2.**[#] AC= ácido clorogênico (g ácido clorogênico/kg FS) **Tabela 3.2.** ND, não detectado, NQ, não quantificado, FS, Fruta Seca, ^{\$}Total de flavonóis = g quercetina 3-glucosídeo/kg FS

Determinação de compostos fenólicos não antociânicos por HPLC-DAD-ESI-MSⁿ...

Tabela 3.4 Perfil de flavonóis (Porcentagem molar de cada flavonol individual) e conteúdo total de flavonóis (g/kg FS, como equivalente de quercetina 3-glicosídeo) e ácido clorogênico (g/kg FS, como equivalente de ácido clorogênico) de diferentes cultivares de mirtilo pertencentes a safra de 2011/2012.

(continua)

Pico*	Highbush Cultivars				Rabitleye Cultivars									
	Bc-2	Co-2	E-2	E-4	Bg-2	Pb-2	Bg-3	Bb-3	C-2	C-3	F-2	F-3	Pb-3	W-3
1	0.29 h	0.85 fgh	ND	0.16 h	5.14 ab	3.12 cde	4.36 abc	2.79 de	2.08 efg	5.71 a	4.59 abc	2.29 ef	0.69 gh	4.13 bcd
2	16.4 a	8.53 b	5.18 c	4.96 c	4.42 c	1.21 fg	5.06 c	0.84 g	3.56 d	2.35 e	1.13 fg	1.69 ef	1.71 ef	1.50 fg
4	1.41 a	1.21 ab	0.27 de	0.35 d	1.43 a	0.64 c	1.45 a	0.25 de	0.94 b	0.45 cd	0.51 cd	1.09 b	0.34 d	ND
6	2.03 b	0.51 g	0.96 de	0.85 de	1.48 c	2.91 a	0.55 fg	ND	0.71 efg	ND	1.04 d	ND	ND	ND
7	ND	ND	9.18 ab	6.84 bc	3.60 def	10.29 a	5.13 cd	0.73 g	10.56 a	1.49 efg	2.11 efg	3.98 de	1.20 fg	ND
8	ND	ND	1.83 b	0.67 c	6.82 a	0.19 c	0.27 c	0.19 c	0.29 c	6.74 a	ND	ND	ND	ND
9	31.84 a	10.07 bc	16.17 bc	20.43 ab	5.94 c	7.83 bc	6.12 c	12.74 bc	8.70 bc	14.29 bc	8.68 bc	7.53 bc	13.67 bc	11.17 bc
10	1.10 ef	20.57 bcd	ND	0.57 f	14.4 bcde	16.63 bcd	10.3 cdef	43.32 a	8.63 def	0.80 ef	23.22 bc	24.1 b	7.66 def	41.98 a
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	10.9 a	4.56 bc	5.76 b	7.02 ab	1.25 cd	1.19 cd	0.90 cd	0.88 cd	1.06 cd	0.69 cd	1.16 cd	0.48 d	1.83 cd	0.80 cd
13	6.80 ab	7.56 a	4.27 b	5.97 ab	0.25 c	0.10 c	0.13 c	0.17 c	0.10 c	ND	ND	ND	0.40 c	ND
14	ND	ND	3.35 a	2.40 b	0.84 d	1.31 c	0.47 e	1.48 c	0.76 de	1.34 c	2.27 b	2.17 b	ND	1.32 c
15	6.81 a	2.35 bc	2.09 bcd	1.80 bcde	2.08 bcd	0.68 ef	3.00 b	0.88 def	1.24 cdef	0.67 ef	0.79 def	0.40 f	1.76 bcdef	1.31 cdef
17	4.82 abc	2.46 cdef	6.89 a	5.20 ab	2.8 bcdef	2.51 cdef	0.41 f	2.22 def	1.01 ef	4.72 abcd	3.07 bcde	0.94 ef	1.29 ef	1.95 ef
19	3.91 bcd	5.73 ab	ND	2.56 cde	3.32 cde	2.17 de	6.32 a	3.04 cde	2.69 cde	3.49 cde	3.15 cde	3.01 cde	1.62 ef	4.21 bc
21	0.38 g	4.60 efg	8.25 bcde	8.19 bcde	10.30 bc	6.94 cde	5.69 def	9.34 bcd	6.54 cde	37.35 a	11.51 b	9.40 bcd	1.33 fg	9.48 bcd
22	0.15 h	ND	22.06 c	17.02 e	19.63 cd	15.85 e	17.96 de	4.30 g	39.76 a	2.52 gh	11.61 f	13.0 f	31.68 d	3.80 g
23	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	5.28 a	ND	ND	2.40 b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25	0.35 b	9.07 a	3.35 ab	2.42 b	2.33 b	1.91b	3.29 ab	0.35 b	2.92 ab	0.90 b	0.64 b	1.34 b	1.60 b	0.57 b
27	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
29	1.68 ab	3.11 a	ND	0.44 b	0.34 b	0.83 b	0.37 b	0.75 b	0.30 b	1.67 ab	ND	2.80 a	0.76 b	ND
30	ND	ND	ND	2.43 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
31	4.06 ab	1.77 bcd	1.43 bcd	1.50 bcd	1.85 bcd	0.66 d	6.04 a	2.01 bcd	1.12 cd	2.08 bcd	0.83 cd	0.82 cd	1.71 bcd	3.45 abc
32	0.95 def	4.47 b	0.07 f	0.34 ef	2.04 cde	1.28 def	6.40 a	1.53 cdef	1.17 def	3.33 bc	1.67 cdef	1.60 cdef	2.29 cd	2.64 cd
33	0.87 cd	3.43 bc	5.29 ab	ND	1.17 cd	1.52 cd	3.37 bc	2.53 cd	1.03 cd	6.60 a	2.72 bc	3.12 bc	1.13 cd	3.40 bc
34	ND	0.43 c	2.06 abc	3.00 abc	5.28abc	5.93 ab	2.24 abc	7.44 a	2.30 abc	2.23 abc	6.23 ab	6.06 ab	0.81 bc	5.77 abc

Tabela 3.4 Perfil de flavonóis (Porcentagem molar de cada flavonol individual) e conteúdo total de flavonóis (g/kg FS, como equivalente de quercetina 3-glicosídeo) e ácido clorogênico (g/kg FS, como equivalente de ácido clorogênico) de diferentes cultivares de mirtilo pertencentes a safra de 2011/2012.

(continuação)

37	ND	ND	ND	ND	ND	10.76 ab	3.56 b	ND	ND	ND	6.53 ab	7.89 ab	16.47 a	ND
38	ND	0.30 a	0.81 a	1.17 a	1.66 a	2.12 a	3.93 a	0.11 a	1.77 a	ND	2.35 a	2.65 a	9.28 a	ND
39	ND	0.23 b	0.33 b	0.73 ab	0.59 ab	0.30 b	1.27 a	0.38 b	0.41b	ND	0.62 ab	0.63 ab	0.78 ab	ND
41	ND	ND	ND	ND	0.29 a	ND	0.27 a	0.20 ab	ND	ND	0.24 ab	ND	ND	ND
44	ND	ND	0.24 abc	ND	0.15b c	0.34 abc	0.54 a	0.33 abc	ND	0.59 a	0.40 ab	0.39 ab	ND	ND
Conteúdo Total	0.9±0.1 bcd	1.0±0.1 bc	1.3±0.1 ab	1.5±0.15 a	0.6±0.05 de	0.6±0.04 cde	0.4±0.0 4e	0.8±0.08 cde	1.0±0.1 bcd	0.4±0.04 e	0.6±0.04 de	0.4±0.04 e	0.9±0.07 cd	0.7±0.04 cde
AC [#]	1.6±0.1 cde	1.3±0.13 def	1.7±0.1 cd	1.8±0.1 cd	2.6±0.1 ab	3.1±0.1 a	0.6±0.06 fgh	0.5±0.04 gh	2.0±0.19 bc	0.2±0.02 h	2.7±0.13 ab	1.0±0.09 efg	0.3±0.01 gh	0.6±0.04 fgh

* A identificação dos flavonóis está na **Tabela 3.2**. AC[#] = ácido clorogênico (g ácido clorogênico/kg FS) **Tabela 3.2**. ND, não detectado, NQ, não quantificado, FS, fruta seca, Total de flavonóis = g quercetina 3-glucosídeo/kg FS

No presente trabalho, as cultivares que apresentaram o maior teor de ácido clorogênico na safra de 2010/2011 foram Florida (F-2) e Bluecrop (Bc-2), produzidas em Vacaria e Elliot (E-1), produzida em Campestre da Serra, não diferindo significativamente a $p \leq 0,05$, e na segunda safra as cultivares com maior teor de ácido clorogênico foram Florida (F-2), Powderblue (Pb-2) e Bluegem (Bg-2), produzidas na cidade de Vacaria, não diferindo significativamente a $p \leq 0,05$. Na literatura uma cultivar muito estudada é Bluecrop, uma das cultivares com maior teor de ácido clorogênico no presente estudo, quando comparado o teor de ácido clorogênico, expresso em fruta fresca, de Bluecrop produzida por diferentes produtores, pertencente as duas safras analisadas, com o trabalho de outros autores [8], pode-se observar que houve uma variação entre 0,037–0,142 g de ácido clorogênico/kg FS, neste estudo, o que está em concordância com estudos prévios, 0,103 g ácido clorogênico/kg FS [8]. No entanto, observa-se na literatura uma variação significativa nos níveis de ácido clorogênico encontrados para esta cultivar, 0,103–1,576 g ácido clorogênico/kg FS [8,11,14].

Além do ácido clorogênico, também foram encontrados 44 flavonóis, muitos em elevadas quantidades nas cultivares de mirtilo analisadas. Dentre os flavonóis encontrados, 40 eram glicosilados, destes a maior parte constituída por derivados de quercetina (14 compostos), seguidos por derivados de miricetina (8 compostos), sirinetina (7 compostos), isorhamnetina (6 compostos), laricitrina (4 compostos) e kaempferol (1 composto). Também encontrou-se 4 flavonóis na forma de agliconas de quercetina, isorhamnetina, laricitrina e sirinetina, provavelmente geradas por hidrólise dos flavonóis glicosilados, durante a preparação das amostras para análise.

De um modo geral, os compostos mais abundantemente encontrados nos frutos foram quercetina 3-rhamnosídeo (pico 22), quercetina 3-glucuronídeo (pico 10), quercetina 3-galactosídeo (pico 9), quercetina 3-pentosídeo (pico 17), miricetina 3-galactosídeo (pico

2) e miricetina 3-rhamnosídeo (pico 7). Sendo que observou-se uma diferenciação entre a espécie Rabbiteye (*Vaccinium ashei* Reade) e a espécie Highbush (*Vaccinium Corymbosum* L.), quanto ao flavonol majoritário encontrado.

Na espécie Highbush a quercetina 3-galactosídeo (pico 9) geralmente apresentou-se como majoritária, também foi observado que quercetina 3-glicosídeo (pico 12) e quercetina 3-(6''-rhamnosil)glicosídeo (pico 13) existem em quantidades relevantes nas cultivares deste grupo e que o derivado de kaempferol (pico 23) só foi encontrado nas cultivares Bluecrop, Coville e Darrow, características estas, consideradas exclusivas desta espécie. No entanto, as cultivares Coville e Bluecrop produzida em Vacaria na safra de 2010/2011, apresentaram como flavonol majoritário a quercetina 3-glucuronídeo (pico 10), geralmente encontrada como majoritária na espécie Rabbiteye e ausente ou minoritária nas demais cultivares da espécie Highbush. Em outros trabalhos encontrados na literatura, ao analisarem mirtilos Highbush, dentre eles a cultivar Bluecrop, também observa-se a quercetina 3-galactosídeo, como o flavonol majoritário no fruto e quando isto não ocorre, encontra-se principalmente quercetina 3-rhamnosídeo [15,16], compostos estes encontrados em grandes quantidades neste trabalho.

As cultivares de *Vaccinium ashei* Reade, na sua maioria (seis cultivares na primeira safra e quatro na segunda safra) apresentaram quercetina 3-rhamnosídeo como o flavonol majoritário e as demais cultivares pertencentes a esta espécie apresentaram quercetina 3-glucuronídeo em maior quantidade. Na literatura, existem poucos trabalhos analisando os flavonóis presentes em mirtilos Rabbiteye, no trabalho de Wang et al. [8], 36 cultivares de *vaccinium ashei* Reade foram avaliadas, entretanto os autores quantificaram apenas quercetina 3-galactosídeo, quercetina 3-glicosídeo, o que não confere com os dados encontrados no presente estudo, já que por mais que quercetina 3-galactosídeo tenha sido encontrada em quantidade significativas em cultivares como Florida, Powderblue, Climax,

Briteblue e Woodard, ela é majoritária apenas nas cultivares da espécie Highbush, enquanto, quercetina 3-glicosídeo não foi encontrada em grandes quantidades em nenhuma cultivar da espécie Rabbiteye, sendo uma característica exclusiva da espécie Highbush.

De acordo com Howard e Hager [16] catorze derivados de quercetina, incluindo compostos acilados com ácido cafeico e acético, foram encontrados no mirtilo, juntamente com quatro derivados de miricetina e dois de campferol. No entanto, no presente trabalho encontrou-se 15 derivados de quercetina, oito da miricetina, oito da siringetina, sete da isorhamnetina, seis da laricitrina, e um do campferol. Existem apenas dois trabalhos na literatura [17,18], onde a presença de 3-*O*-glicosídeos de laricitrina e siringetina foi detectada em mirtilo. E apenas Vrhovsek e colaboradores [18], encontraram anteriormente 3-*O*-glicosídeos de isorhamnetina, 3-*O*-galactosídeos de laricitrina, siringetina e isorhamnetina e 3-*O*-rhamnosídeos de miricetina e laricitrina em mirtilos.

Informação importante encontrada neste trabalho, foi a identificação de derivados 3-*O*-glucuronídeos, não encontrados anteriormente na literatura, para mirtilos, como quercetina 3-glucuronídeo e miricetina 3-glucuronídeo, um dos flavonóis majoritários em uma variedade de uva não vinífera, BRS Lorena [19] e em uvas viníferas como Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon [20], siringetina 3-glucuronídeo encontrada anteriormente em uvas Garnacha tintorera [21] e laricitrina, 3-glucuronídeo que não foi encontrado nenhum relato na literatura sobre sua presença em outras frutas.

Foram encontradas três formas de flavonóis acilados, derivados de quercetina, miricetina, isorhamnetina e siringetina. Dentre os 14 flavonóis acilados encontrados no presente estudo, destaca-se a quercetina 3-(6''-rhamnosil)-glicosídeo (rutina), comumente encontrada em mirtilos [15,17,18], por apresentar-se em quantidades significativas nas cultivares de mirtilo Highbush, já em mirtilos Rabbiteye as quantidades encontradas sempre eram inferiores e em algumas cultivares não foi possível de ser detectada (**Tabela 3.3 e 3.4**).

Dados da literatura [22] indicam que a rutina é um potente quelante de metais de transição e que o desenvolvimento da rutina como um fitoquímico em plantas, pode ser resultado de um possível mecanismo de sobrevivência em plantas que sofrem um estresse oxidativo, induzido por radicais livres, no qual a oxidação do Fe^{2+} pode estar envolvida. Os demais flavonóis ligados a um grupo rhamnosil encontrados neste trabalho (miricetina 3-(6''-rhamnosil)-galactosídeo, miricetina 3-(6''-rhamnosil)-glicosídeo, quercetina 3-(6''-rhamnosil)-galactosídeo, isorhamnetina 3-(6''-rhamnosil)-galactosídeo e isorhamnetina 3-(6''-rhamnosil)-glicosídeo), não foram encontrados em outros estudos com mirtilo, existentes na literatura. No entanto isorhamnetina 3-(6''-rhamnosil)-glicosídeo já foi encontrada anteriormente em cerejas [23] e “*elderberry*” [24].

Outro grupo de derivados acilados de flavonóis encontrados foram os derivados acetilados de quercetina (3-(6''-acetil)-galactosídeo e 3-(6''-acetil)-glicosídeo), de isorhamnetina (3-(6''-acetil)-hexosídeo) e de siringetina (3-(6''-acetil)-glicosídeo), sendo que destes, apenas os derivados de quercetina já foram encontrados em mirtilos [15].

Para finalizar, um terceiro derivado acilado foi encontrado, pela primeira vez em mirtilos. O composto 38, foi identificado como quercetina-3-*O*-[4''-(3-hydroxi-3-metilglutaroil)]- α -rhamnose (HMG-rhm) através da análise de LC-MS, subsequente fragmentação do íon dominante MS^2 e fragmentação no MS^3 (**Figura 3.3**), que foram utilizadas para obtenção de maiores informações sobre a massa molecular dos conjugados, massas dos açúcares ligados às agliconas, e estrutura das agliconas. Observou-se que este composto é característico de duas cultivares pertencentes a espécie *Rabbiteye*, Florida e Powderblue, aparecendo como um dos flavonóis majoritários em todas as amostras destas cultivares analisadas, tanto nas amostras produzidas na cidade de Erechim, quanto na cidade de Vacaria, tanto na primeira quanto na segunda safra.

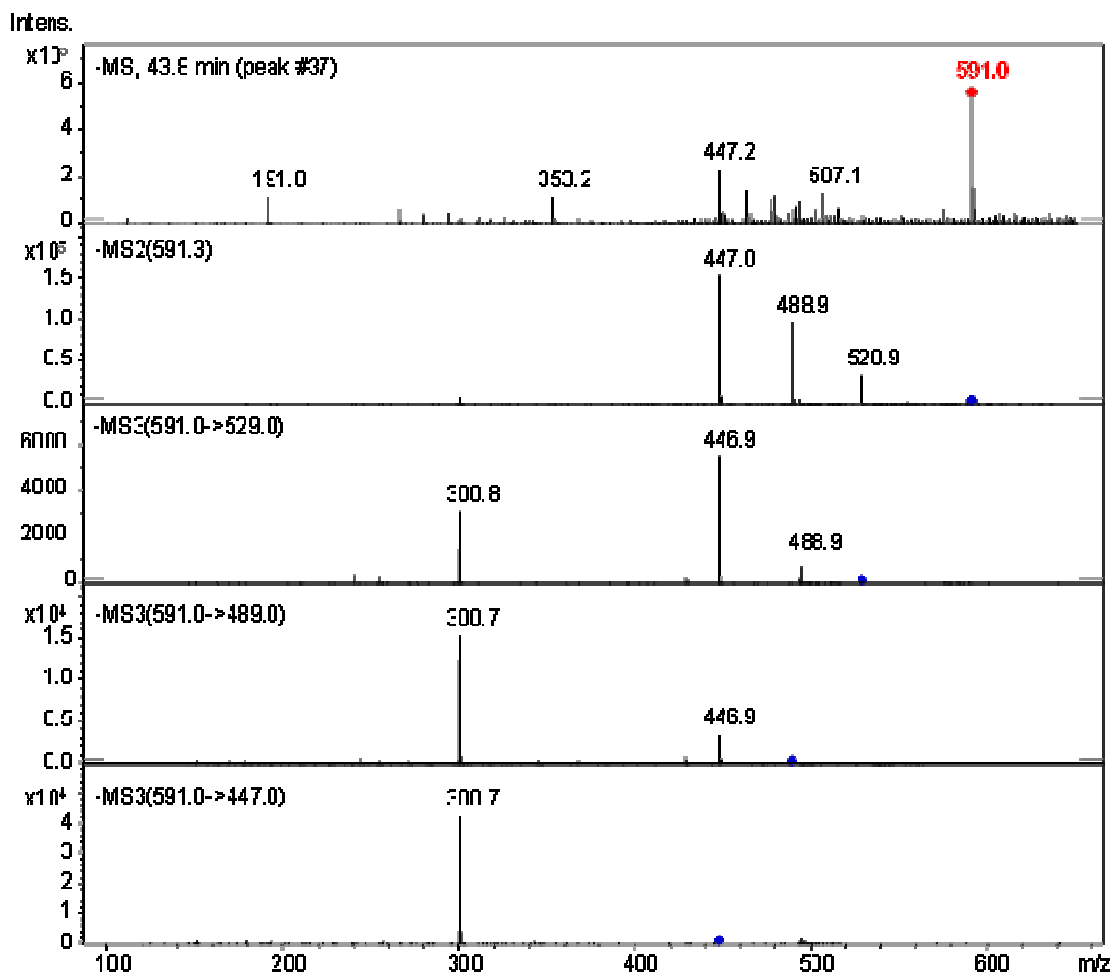


Figura 3.3 Dados de espectrometria de massas do composto 38, quercetina-3-*O*-[4''-(3-hidroxi-3-metilglutaroil)]- α -rhamnose.

3.2 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (PCA), foi utilizada para classificar as trinta amostras de mirtilo de acordo com a sua composição relativa de flavonóis e ácido clorogênico. Para isto, 44 flavonóis e o ácido clorogênico (**Tabela 3.2**) foram incluídos e três classes foram selecionadas para avaliar a separação, safra (2010/2011 e 2011/2012), produtor (1, 2, 3 e 4) e espécie (Highbush e Rabbiteye). As duas componentes principais (PC1 e PC2), descreveram 55% da variância total dos dados.

Pode-se observar na **Figura 3.4 (a)**, que a análise de componentes principais aplicada as cultivares de mirtilo, somente permitiu agrupar estas cultivares de acordo com a

espécie a qual elas pertencem, não havendo separação devido ao ano da safra e nem ao local de produção dos frutos. Análises estatísticas similares foram realizadas para várias classes de compostos fenólicos (ácidos fenólicos, antocianinas, flavanóis, flavonóis e estilbenos) em mirtilos europeus, plantados em diferentes locais da Eslovênia, conseguindo distinguir os mirtilos por região [25], entretanto além dos autores avaliarem parâmetros como antocianinas, flavanóis, e estilbenos, que não foram analisados neste estudo, eles observaram que as regiões onde os frutos foram produzidos diferiam climaticamente, o que não ocorreu em nosso trabalho.

Pelos gráficos de *scores* e *loadings* (**Figura 3.4 (a)** e **3.4 (b)**), observa-se que houve a separação das espécies Highbush e Rabbiteye, na primeira componente principal. Ácido clorogênico, e mais onze flavonóis possuem scores altamente positivos na PC1, o que contribuiu para a separação da espécie Highbush. No entanto, dentro desta espécie as cultivares Coville (Co-2) e Bluecrop (BC-2) de Vacaria, pertencente a safra 2010/2011 se encontram próximo ao zero da PC1 o que não permite atribuir, pela análise de PCA, qual composto fenólico foi importante para a sua separação. Todavia, sabe-se que estas duas cultivares foram as únicas da espécie Highbush que não apresentaram quercetina 3-galactosídeo como flavonol majoritário e sim quercetina 3-glucuronídeo, o que é característico de muitas cultivares da espécie Rabbiteye e que provavelmente dificultou a separação na PC1.

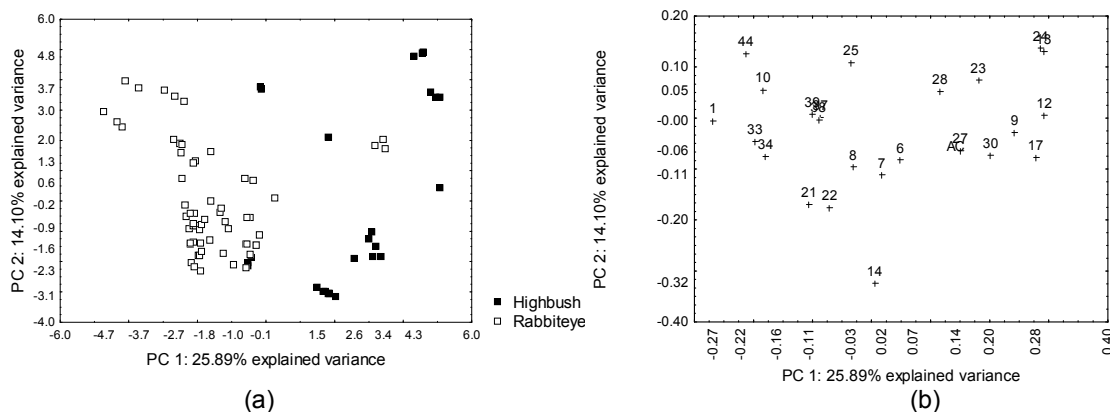


Figura 3.4 Análise de componentes principais (PCA) nas cultivares de mirtilo pertencentes aos quatro produtores e duas safras, (a) Gráfico de scores para PC1 (fator 1) e PC2 (fator 2), diferenças entre classes (espécies); (b) Gráfico de loadings para PC1 (fator 1) e PC2 (fator 2), identificação dos picos, pode ser visualizada na (Tabela 3.2).

4 CONCLUSÃO

Quarenta e quatro flavonóis foram encontrados, além do ácido clorogênico. Destes, muitos compostos não tinham sido encontrados em mirtilo anteriormente. Foi observado que existem diferenças nos flavonóis majoritários dependendo da espécie de mirtilo, Highbush apresenta quercetina 3-galactosídeo como majoritário e quercetina 3-glicosídeo em grandes quantidades, enquanto a espécie Rabbiteye tem como majoritários quercetina 3-rhamnosídeo e quercetina 3-glucuronídeo. A análise estatística mostrou que o perfil de compostos fenólicos (incluindo 44 flavonóis e ácido clorogênico) pode ser usado para distinguir as espécies de mirtilo (Highbush e Rabbiteye), no entanto, não demonstraram uma separação quanto as cultivares e local de produção dos frutos.

5 AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo apoio financeiro, e a UNICAMP, UFMT e UCLM pelo incentivo a pesquisa.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] B.C. Strik, Berry crops: Worldwide area and production systems (2007) In: Y. Zhao, Berry Fruit Value-Added Products for Health Promotion, CRC PRESS, TAYLOR AND FRANCIS GROUP.
- [2] FAO. Food and agriculture organizationos the United Nations. 2013. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acessado em: 14 de abril de 2013.
- [3] R.L. Prior, G. Cao, A. Martin, E. Sofic, J. Mcewen, C. O'brien, N. Lischner, M. Ehlenfeldt, W. Kalt, G. Krewer, C.M. Mainland, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 2686-2693.
- [4] C. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Free Radical biology and medicine. 20 n.7 (1996) 933-956.
- [5] R.A. Moyer, K.E. Hummer, C.E. Finn, B. Frei, R.E. Wrolstad, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 519-525.
- [6] P.B. Pertuzatti, M.T. Barcia, A.C. Jacques, M. Vizzotto, H.T. Godoy, R.C. Zambiasi, The Natural Products Journal. 2 (2012) 188-195.
- [7] N. Castillo-Muñoz, S. Gómez-Alonso, E. García-Romero, I. Hermosín-Gutiérrez, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 992–1002.
- [8] S.Y. Wang, H. Chen, M.J. Camp, M.K. Ehlenfeldt, Food Chem. 132 (2012) 855-864.
- [9] G.G. Yousef, A.F. Brown, Y. Funakoshi, F. Mbeunkui, M.H. Grace, J.R. Ballington, A. Loraine, M.A. Lila, J. Agric. Food Chem. 61 (2013) 4806-4815.
- [10] K. Dastmalchi, G. Flores, V. Petrova, P. Pedraza-Peñalosa, E.J. Kennelly, J. Agric. Food Chem. 59 (2011) 3020-3026.

- [11] A. Rodriguez-Mateos, T. Cifuentes-Gomez, S. Tabatabaee, C. Lecras, J.P.E. Spencer, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 5772-5778.
- [12] J. Lindsay, D. Laurin, R. Verreault, R. Hebert, B. Helliwell, G.B. Hill, I. McDowell, *Am. J. Epidemiol.* 156 (2002) 445-453.
- [13] INMET (Instituto Nacional de Meteorologia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil). Estações Automáticas: Gráficos, 2013. URL http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf. Accessed 04/01/13.
- [14] T.G. Taruscio, D.L. Barney, J. Exon, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3169-3176.
- [15] M.J. Cho, L.R. Howard, R.L. Prior, J.R. Clark, *J. Sci. Food Agric.* 85 (2005) 2149-2158.
- [16] L.R. Howard, T.J. Hager, in: Y. Zhao (Eds.), *Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion* pp. CRC Press, New York, 2007, 74-99.
- [17] V. Gavrilova, M. Kajdzanoska, V. Gjamovski, M. Stefova, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 4009-4018.
- [18] U. Vrhovsek, D. Masuero, L. Palmieri, F. Mattivi, *J. Food Comp. Analysis.* 25 (2012) 9-16.
- [19] M.T. Barcia, P.B. Pertuzatti, S. Gómez-Alonso, H.T. Godoy, I. Hermosín-Gutiérrez, *Food Chem.* 159 (2014) 95-105.
- [20] M.T. Barcia, P.B. Pertuzatti, D. Rodrigues, S. Gómez-Alonso, I. Hermosín-Gutiérrez, H.T. Godoy, *Food Research International.* 62 (2014) 500-513.
- [21] N. Castillo-Muñoz, M. Fernández-González, S. Gómez-Alonso, E. García-Romero, I. Hermosín-Gutiérrez, *J. Agric Food Chem.* 57 (2009) 7883-7891.
- [22] P.A. Omololu, J.B.T. Rocha, I.J. Kade, *Experimental and Toxicologic Pathology.* 63 (2011) 249-255.

- [23] A. Kirakosyan, E.M. Seymour, K.R. Noon, D.E.U. Llanes, P.B. Kaufman, S.L. Warber, S.F. Bolling, Food Chem. 122 (2010) 78-83.
- [24] J. Lee, C.E. Finn, J. Sci. Food Agric. 87 (2007) 2665-2675.
- [25] S. Moze, T. Polak, L. Gasperlin, D. Koron, A. Vanzo, N.P. Ulrih, V. Abram, J. Agric. Food Chem. 59 (2011) 6998-7004.

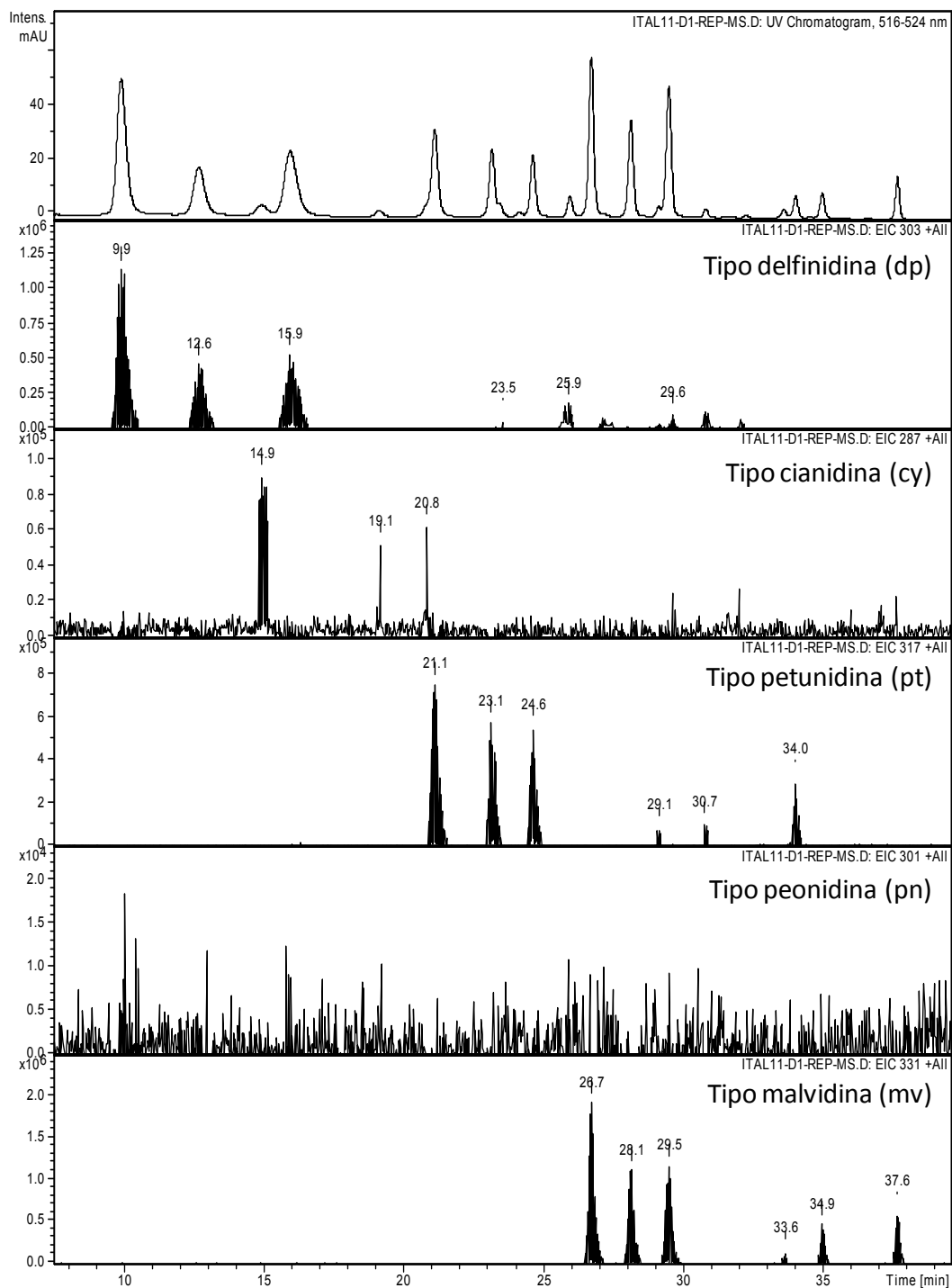
CONCLUSÕES GERAIS

Através deste trabalho, foi possível concluir que os mirtilos produzidos no Brasil, são excelentes fontes de compostos fenólicos correlacionando-se positivamente com a capacidade antioxidante, que é muito superior nos extratos hidrofílicos do que nos extratos lipofílicos de mirtilo, devido ao fato destes frutos possuírem pequenas quantidades de carotenoides. Em função disto, houve uma separação dos extratos hidrofílicos de acordo com o produtor e ano da safra, enquanto os extratos lipofílicos se agruparam de acordo com a espécie de mirtilo (Rabbiteye ou Highbush).

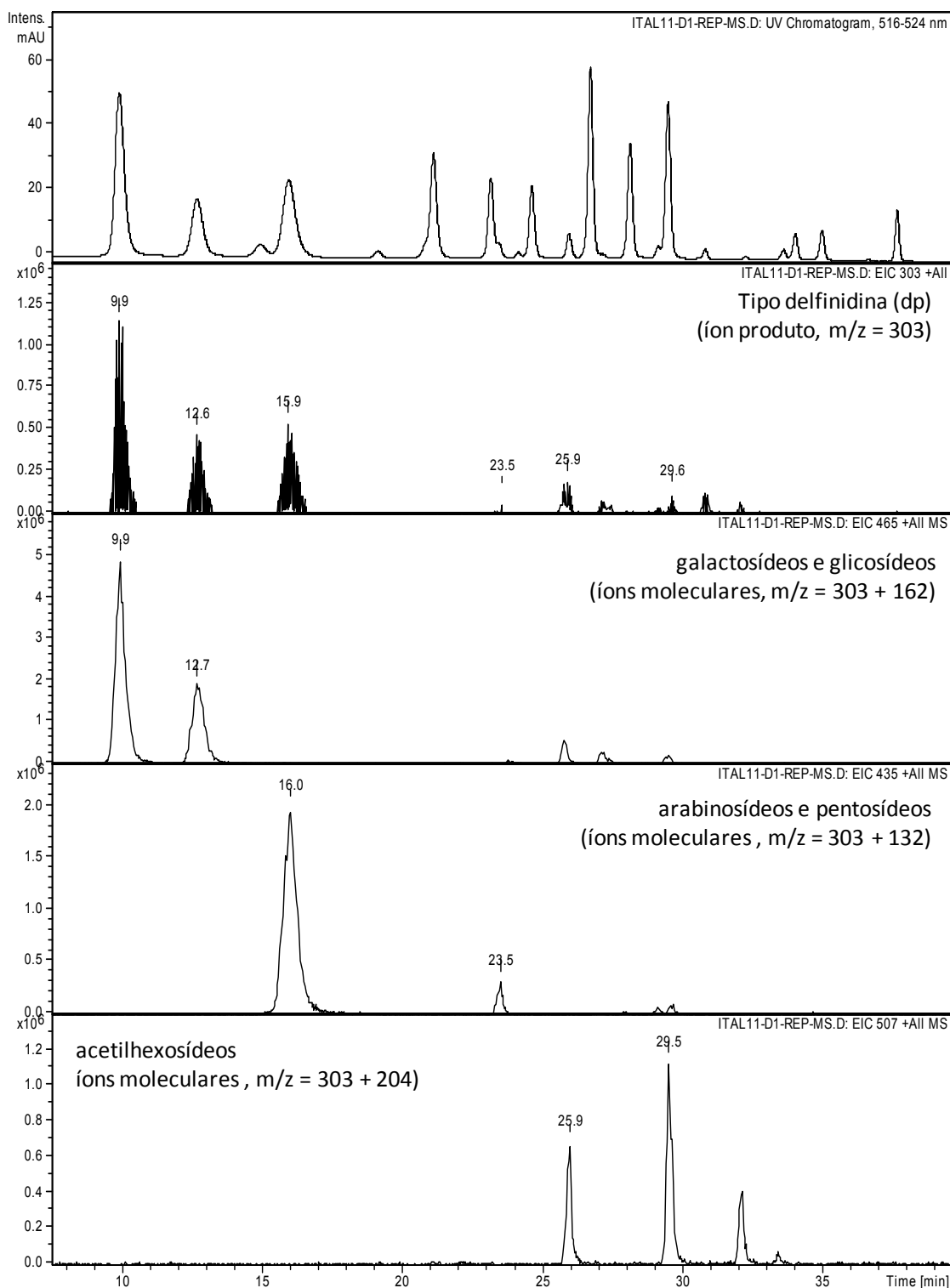
Em relação as análises cromatográficas, observou-se diferentes perfis de compostos fenólicos nos frutos, de um modo geral foram encontradas 36 antocianinas, 44 flavonóis e um ácido hidroxicinâmico, ácido clorogênico, nos mirtilos, muitos compostos foram identificados pela primeira vez neste fruto. Houve uma diferenciação entre as cultivares do grupo Rabbiteye e as cultivares do grupo Highbush, as primeiras apresentaram um conteúdo maior de antocianinas enquanto as cultivares do grupo Highbush possuem um conteúdo maior de flavonóis e são praticamente as únicas a apresentar antocianinas acetiladas.

APÊNDICES

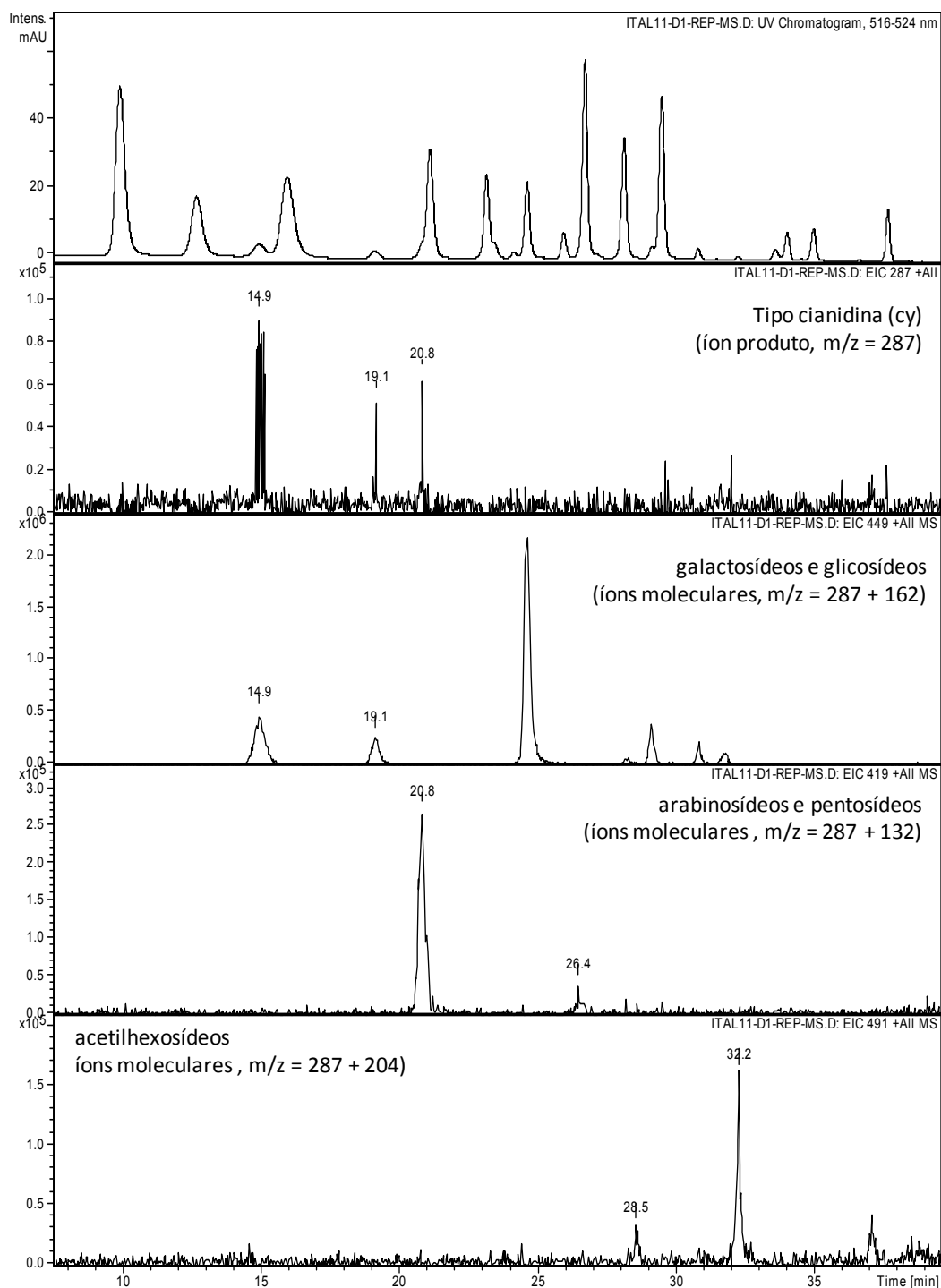
Apêndice 1. Exemplo do perfil cromatográfico mais completo (36 antocianinas – Perfil tipo Bc-2) encontrado nos mirtilos analisados com dados de espectrometria de massa (ESI MS/MS) das antocianinas encontradas.



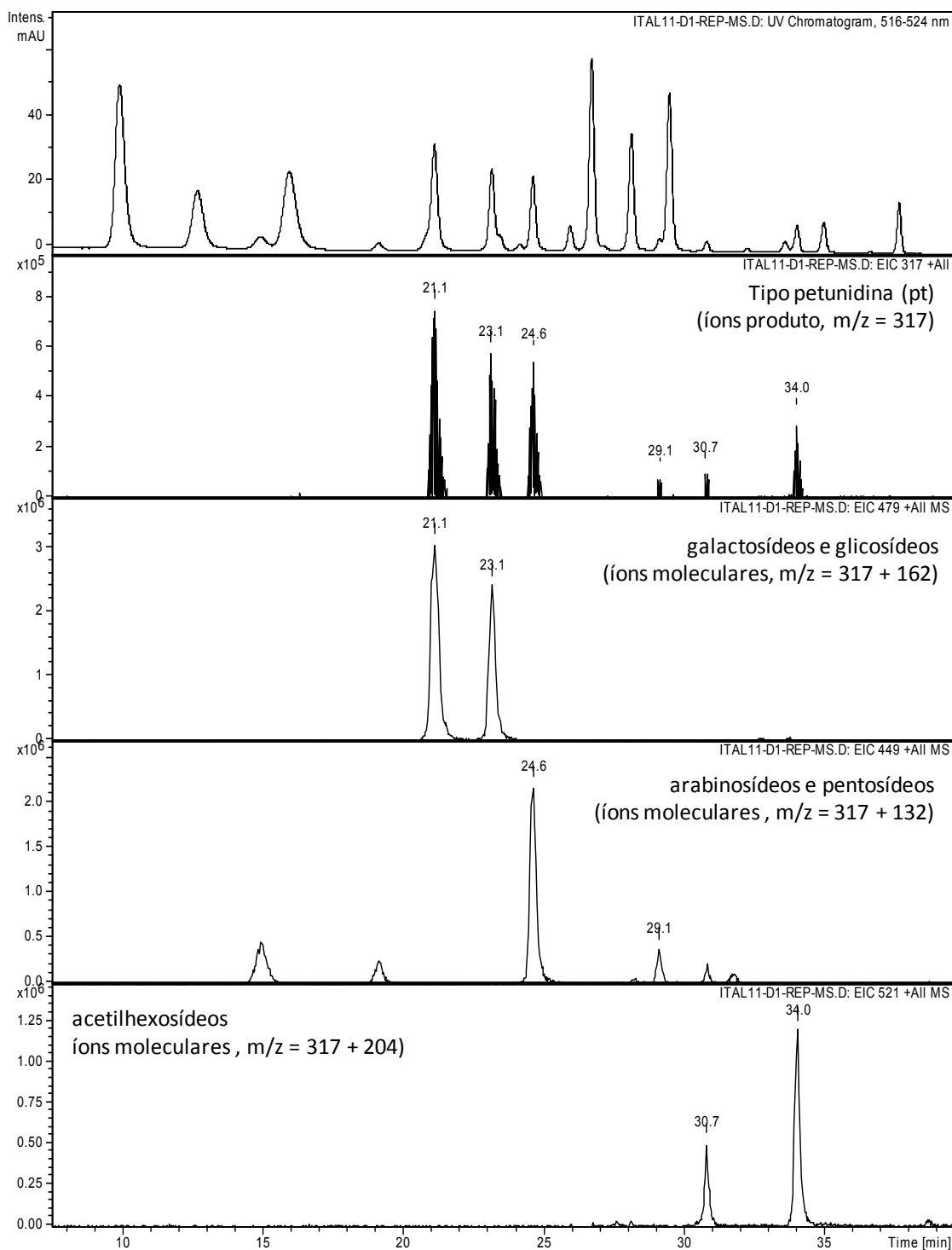
Apêndice 2. Exemplo do perfil cromatográfico mais completo (36 antocianinas – Perfil tipo Bc-2) encontrado nos mirtilos analisados com dados de espectrometria de massa (ESI MS/MS) dos derivados ligados a delphinidina.



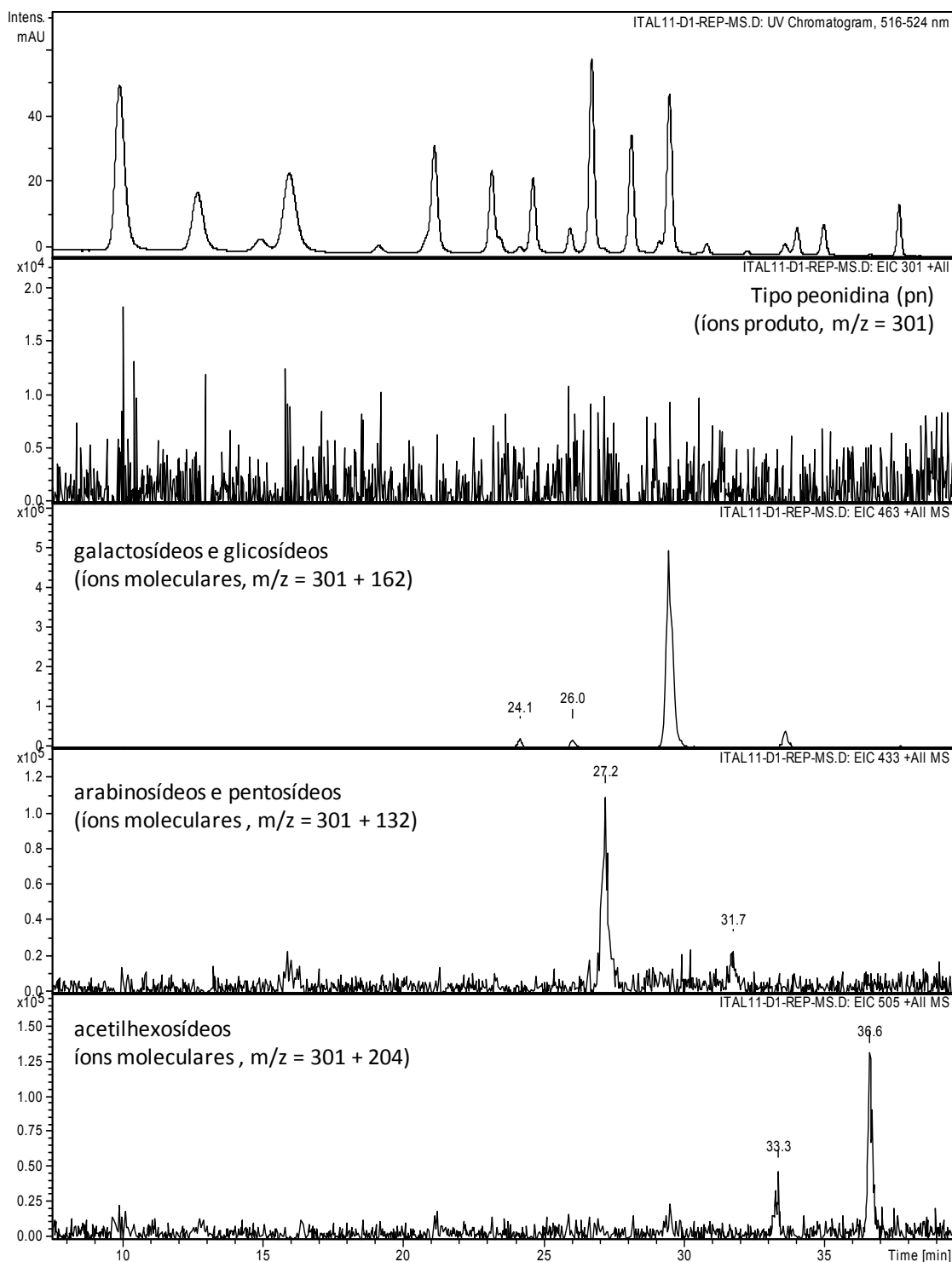
Apêndice 3. Exemplo do perfil cromatográfico mais completo (36 antocianinas – Perfil tipo Bc-2) encontrado nos mirtilos analisados com dados de espectrometria de massa (ESI MS/MS) dos derivados ligados a cianidina.



Apêndice 4. Exemplo do perfil cromatográfico mais completo (36 antocianinas – Perfil tipo Bc-2) encontrado nos mirtilos analisados com dados de espectrometria de massa (ESI MS/MS) dos derivados ligados a petunidina.



Apêndice 5. Exemplo do perfil cromatográfico mais completo (36 antocianinas – Perfil tipo Bc-2) encontrado nos mirtilos analisados com dados de espectrometria de massa (ESI MS/MS) dos derivados ligados a peonidina.



Apêndice 6. Exemplo do perfil cromatográfico mais completo (36 antocianinas – Perfil tipo Bc-2) encontrado nos mirtilos analisados com dados de espectrometria de massa (ESI MS/MS) dos derivados ligados a malvidina.

