Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Dissertação

Morango (*Fragaria x ananassa*), amora-preta (*Rubus* spp.) e mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade): caracterização química, atividade antioxidante e ação sobre as enzimas digestivas alfa-glicosidase e alfa-amilase em dois ciclos produtivos das frutíferas

Taiane Mota Camargo

Pelotas, 2019

Taiane Mota Camargo

Morango (*Fragaria x ananassa*), amora-preta (*Rubus* spp.) e mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade): caracterização química, atividade antioxidante e ação sobre as enzimas digestivas alfa-glicosidase e alfa-amilase em dois ciclos produtivos das frutíferas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (área do conhecimento: frutas e hortaliças).

Comitê de Orientação: PhD. Leonardo Nora
PhD. Márcia Vizzotto
Dr. Gabriel Dalmazo

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C172m Camargo, Taiane Mota

"Morango (Fragaria x ananassa), amora-preta (Rubus spp.) e mirtilo (Vaccinium ashei Reade): caracterização química, atividade antioxidante e ação sobre as enzimas digestivas alfa-glicosidase e alfa-amilase em dois ciclos produtivos das frutíferas" / Taiane Mota Camargo ; Leonardo Nora, orientador ; Marcia Vizzotto, Gabriel Dalmazo, coorientadores. — Pelotas, 2019.

94 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Frutas vermelhas. 2. Diabetes mellitus. 3. Compostos fenólicos. I. Nora, Leonardo, orient. II.

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca examinadora:

Prof. Dr. Leonardo Nora

Drª Márcia Vizzotto

Profª Drª. Helayne Aparecida Maieves

Profª Drª Rosana Colussi

Prof. Dr. Valdecir Carlos Ferri

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas às pessoas que me ajudaram até aqui, acreditaram em mim e me fizeram acreditar que todo sonho é possível.

Agradecimentos

A Deus pela oportunidade. Ao universo por me permitir estar onde estou, vivendo o que sempre desejei.

À minha família por todo apoio e amor incondicional sempre, meus pais pelos ensinamentos, à minha mãe por todo o companheirismo, compreensão e ajuda. Aos meus irmãos por estarem sempre ao meu lado em todas as minhas escolhas, e à tia Dilza, pessoa que com orgulho eu chamo de segunda mãe, e que sempre faz com que acreditemos que todo sonho é possível. Eu amo vocês mais do que tudo!

A todas as pessoas que conheci nesta caminhada, e, principalmente, aos meus amigos que fizeram destes anos alguns dos melhores que eu já vivi. Vocês fizeram toda a diferença nos meus dias, nunca vou poder agradecer suficientemente por ter todos vocês na minha vida!

Aos meus orientadores Leonardo Nora, Márcia Vizzotto e Gabriel Dalmazo por todos as sugestões, suporte e ensinamentos e por toda a paciência com meus momentos de dúvidas, incertezas e inseguranças. Aprendi muito com vocês.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, obrigada por me proporcionarem a realização deste sonho.

À Embrapa por todo apoio, que através da pesquisadora Márcia Vizzotto, pessoa que admiro muito, me proporcionaram parte significativa da estrutura para execução do trabalho e apoio em todos os momentos. Márcia, obrigada por todas as oportunidades. Aos demais pesquisadores com quem pude conviver e aprender, meu muito obrigado!

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Resumo

Camargo, Taiane Mota. **Morango (*Fragaria x ananassa*), amora-preta (*Rubus* spp.) e mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade): caracterização química, atividade antioxidante e ação sobre as enzimas digestivas alfa-glicosidase e alfa-amilase em dois ciclos produtivos das frutíferas.** 2019. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a *Diabetes mellitus* é uma doença crônica não-transmissível, que no ano de 2014 já atingia 422 milhões de pessoas em todo o mundo, com tendência de crescimento. Dentre as estratégias de tratamento da doença está a utilização de inibidores de enzimas digestivas (alfa-glicosidase e alfa- amilase), responsáveis pelo metabolismo de carboidratos. Este estudo foi dividido em três capítulos, com dois artigos inseridos. O primeiro artigo é uma revisão bibliográfica que aborda a composição química e as atividades biológicas relatadas na literatura de morango, amora-preta e mirtilo. O segundo artigo aborda um experimento em dois ciclos produtivos (2016 e 2017), onde foram caracterizados dois genótipos de morango (Camarosa e acesso 2011-6011), dois genótipos de amora-preta (Tupy e Xingú) e um genótipo de mirtilo (O'Neal). As variáveis analisadas foram: acidez, pH, sólidos solúveis, umidade, cinzas, lipídios, fibras, compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides, atividade antioxidante (DPPH, hidroxila e óxido nítrico), inibição de alfa- glicosidase e inibição de alfa-amilase. Dentre os resultados destacam-se: (1) a concentração de compostos fenólicos totais foi maior nas frutas do ciclo produtivo de 2016, à exceção da amora-preta do genótipo Xingú. (2) No ciclo produtivo de 2016 a concentração de antocianinas foi maior na amora-preta (Tupy e Xingú) e no mirtilo (O'Neal), entretanto, no ciclo produtivo de 2017, os dois genótipos de morango apresentaram maiores concentrações de antocianina. (3) Em todos os genótipos, à exceção do genótipo Tupy de amora-preta, a concentração de flavonoides foi mais elevada no ciclo produtivo de 2017. (4) Todos os genótipos atingiram IC_{25} para a enzima alfa-amilase e IC_{50} para a enzima alfa-glicosidase, com destaque para a amora preta do genótipo Tupy, do ciclo produtivo 2017, que resultou em inibição 7 vezes maior do que o controle positivo (acarbose) para a enzima alfa-amilase, e no menor IC_{50} para a alfa-glicosidase dentre os genótipos testados, sendo que o controle positivo quercetina (0,5 mg/mL a 500,0 mg/mL) não inibiu a alfa-glicosidase. À exceção do genótipo 2011-6011 de morango, todos os demais foram capazes de capturar 50 % dos radicais livres testados, ao contrário da acarbose, que não capturou nenhum dos radicais, e a quercetina que capturou apenas o DPPH. Em conclusão, os resultados demonstram que os genótipos testados de morango, amora-preta e mirtilo possuem potencial de uso no tratamento e prevenção da diabete, além de possuírem atividade antioxidante.

Palavras-chave: frutas vermelhas, *Diabetes mellitus*, compostos fenólicos.

Abstract

Camargo, Taiane Mota**. Strawberry (Fragaria x ananassa), blackberry (Rubus spp.) And blueberry (Vaccinium ashei Reade): chemical characterization, antioxidant activity and action on the digestive enzymes alpha-glycosidase and alpha-amylase in two productive cycles of fruit.** 2019. 94 p. Dissertation (Master in Food Science and Technology) - Graduate Program in Food Science and Technology, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2019.

Diabetes mellitus is a non-transmissible chronic disease, which by the year 2014 has reached 422 million people worldwide, with a growing trend. Among the strategies to treat this disease is the use of inhibitors of digestive enzymes (alpha-glucosidase and alpha-amylase), responsible for the metabolism of carbohydrates. This study was divided into three chapters, with two articles inserted. The first article is a review that addresses the chemical composition and biological activities reported in the strawberry, blackberry and blueberry. The second article discusses an experiment in two productive cycles (2016 and 2017), where two strawberry genotypes (Camarosa and access 2011-6011), two blackberry (Tupy and Xingú) genotypes and one blueberry genotype (O´Neal). The variables analyzed were acidity, pH, soluble solids, moisture, ashes, lipids, fibers, phenolic compounds, anthocyanins, flavonoids, antioxidant activity (DPPH, hydroxyl and nitric oxide), inhibition of alpha-glucosidase and inhibition of alpha- amylase. Among the results, we highlight: (1) the concentration of phenolic compounds was higher in the genotypes of the productive cycle of 2016, except for blackberry Xingú genotype. (2) In the production cycle of 2016 anthocyanins concentration was higher in blackberry (Tupy and Xingú) and blueberry (O'Neal), however, in the productive cycle of 2017, the two strawberry genotypes showed higher concentrations of anthocyanin. (3) In all genotypes, with the exception of the blackberry Tupy genotype, the concentration of flavonoids was highest in the production cycle of 2017. (4) All genotypes reached IC_{25} for the enzyme alpha-amylase and IC50 for the enzyme alpha-glycosidase. Remarkably, in the production cycle 2017, the blackberry Tupy genotype resulted in inhibition 7 times higher than the positive control (acarbose) for the alpha-amylase enzyme, and in the lowest IC50 for alpha-glucosidase among the testes genotypes. Interestingly, acarbose (0.5 mg / mL to 500.0 mg / mL) did not inhibit alpha-glucosidase. With the exception of the strawberry genotype 2011-6011, all the others genotypes were able to capture 50 % of the free radicals tested, unlike acarbose, which did not capture any of the radicals, and quercetin that only captured DPPH. In conclusion, the results demonstrate that the tested strawberry, blackberry and blueberry genotypes have potential for use in the treatment and prevention of diabetes, besides having antioxidant activity.

Key words: red fruits, *Diabetes mellitus*, phenolic compounds.

Lista de figuras

Figura 1 Morango *in natura* 19

Figura 2 Amora-preta *in natura* 20

Figura 3 Mirtilo *in natura* 21

Figura 4 Regulação da absorção da glicose antes e após a refeição..... 23

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1

Tabela 1 Carboidratos, fibras, proteínas, lipídeos e conteúdo de açúcares solúveis em morango, amora-preta e mirtilo..... 38

Tabela 2 Teor de vitaminas em morango, amora-preta e mirtilo 40

Tabela 2 Teor de minerais em morango, amora-preta e mirtilo..... 42

Tabela 3 Compostos fenólicos individuais identificados nas pequenas frutas morango, amora-preta e mirtilo 45

CAPÍTULO 3

ARTIGO 2

Tabela 1 Acidez, pH, sólidos solúveis, umidade, cinzas, gorduras totais fibras contidos em cultivares de amora-preta, morango e mirtilo, em dois ciclos produtivos..... 80

Tabela 2 Compostos fenólicos totais (CFT), antocianinas totais (AT) e flavonoides totais (FT) dos genótipos de morango, amora-preta e mirtilo nos dois ciclos produtivos..... 82

Tabela 3 Inibição da enzima alfa-amilase, expressa em IC_{25} e alfa-glicosidase, atividade antioxidante pela captura dos radicais DPPH, hidroxila e óxido nítrico, expressas em IC_{50}..... 86

Lista de Abreviaturas e Siglas

DM	*Diabetes mellitus*
DM2	*Diabetes mellitus* tipo 2
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
IC_{50}	Concentração de inibição de 50 %
IC_{25}	Concentração de Inibição de 25 %
ERO	Espécie reativa de oxigênio

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....14
1.1 Hipóteses 15
1.2 Objetivos. 15
1.2.1 Objetivo Geral 16
1.2.2 Objetivos específicos. 17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1 Pequenas frutas 17
2.1.1 Morango (*Fragaria x ananassa*) 17
2.1.2 Amora-preta (*Rubus* spp.) 19
2.1.3 Mirtilo *(Vaccinium ashei Reade)*.....20
2.2 Pequenas frutas e potencial antidiabético 22
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 25

CAPÍTULO 1 29
Projeto de Pesquisa 29
Caracterização do problema.....30
Objetivos e Metas.....31
Metodologia. 31
Resultados Esperados. 31
Delineamento Experimental..... 32
Referências Bibliográficas. 32

CAPÍTULO 2 34
ARTIGO 1.....34
1. INTRODUÇÃO. 36
2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....37
2.1 Composição nutricional das pequenas frutas.....37
3. FITOQUÍMICOS 43
3.1 Compostos voláteis. 43
3.2 Compostos fenólicos. 44
4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS 46

4.1 Atividade antioxidante.....46
4.2 Atividade antidiabética.....47
4.3 Atividade antilipidêmica..... 49
4.4 Atividade anticancerígena.....50
4.5 Atividade anti-inflamatória.....51
4.6 Atividade anti-envelhecimento.....53
4.7 Atividade Antimicrobiana..... 55
5. CONCLUSÃO.....55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56

CAPÍTULO 3 69
ARTIGO 2.....69
1. INTRODUÇÃO. 72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....73
2.1 Padrões e reagentes.....73
2.2 Aquisição da amostra.....74
2.3 Preparação dos extratos.....74
2.4 Caracterização físico-química.....75
2.4.1 Determinação de pH.....75
2.4.2 Acidez total ou acidez titulável.....75
2.4.3 Determinação de matéria seca.....75
2.4.4 Determinação de Cinzas.....75
2.4.5 6Determinação de lipídeos.....75
2.4.6 Determinação de Fibra Bruta.....76
2.4.7 Determinação de sólidos solúveis (ºBrix).....74
2.5 Composição química..... 76
2.5.1 Compostos fenólicos totais.....76
2.5.2 Antocianinas totais. 77
2.5.3 Flavonoides totais.....77
2.6 Atividade antioxidante e inibição das enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase.....77
2.6.1 Geral.....77
2.6.2 Inibição da alfa-glicosidase.....78

2.6.3 Inibição da alfa-amilase 78
2.6.4 Atividade sequestrante do radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 79
2.6.5 Atividade sequestrante do radical hidroxila 77
2.6.6 Atividade sequestrante do radical óxido nítrico 77
2.7 Análise estatística 78
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO. 80
3.1 Caracterização físico-química 80
3.2 Composição química 81
3.2.1 Compostos fenólicos totais, antocianinas totais e flavonoides totais. 81
3.2.2 Atividade antioxidante e inibição das enzimas alfa-glicosidase e alfa-amilase 83
4. Conclusão 87
5. Referências bibliográficas 87
Considerações Finais. 95

1. INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é classificada como uma doença crônica não- transmissível, caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Nas últimas décadas, o DM tem se tornado um sério e crescente problema de saúde pública, devido ao aumento de sua prevalência. O *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) é a forma da doença prevalente, atingindo 300 milhões de indivíduos no mundo. Cerca de 20% dos adultos entre 65 e 76 anos já possuem diagnóstico de DM2. No Brasil, 9,7% das pessoas com mais de 35 anos são diabéticas (Cobas et al., 2010; De Oliveira et al., 2012).

Um dos mecanismos de atuação para o controle da DM, é a inibição de enzimas digestivas, como a alfa-glicosidase e alfa-amilase. Estas enzimas atuam no sistema digestório, hidrolisando o amido e liberando glicose e oligossacarídeos. A inibição pode retardar e prolongar o tempo de digestão de carboidratos, reduzindo assim, a quantidade de glicose absorvida, e, consequentemente, o aumento brusco da glicemia pós-prandial (aumento do nível de glicose no sangue após as refeições). Os inibidores de glicosidases são exemplos de antidiabéticos orais (Yamagishi et al., 2009; Sales et al., 2012). A acarbose é um exemplo de inibidor da alfa-glucosidase, pois diminui as chances de pacientes com problemas de intolerância à glicose tornarem-se diabéticos (Cheng et al., 2004). Em contraponto, o uso deste medicamento causa efeitos adversos e indesejáveis, como flatulência, dor abdominal e diarreia durante sua administração (Weinert et al., 2015). Assim, a busca por compostos antidiabéticos naturalmente presentes em frutas e hortaliças, que não desencadeiem efeitos colaterais, tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos.

Atualmente, sabe-se que um denominador comum na patogênese da maioria das doenças crônicas é a ocorrência do estresse oxidativo, que é ocasionado pelo desequilíbrio na produção de ERO´s (espécies reativas de oxigênio) e sua eliminação. Paralelamente, um crescente número de estudos epidemiológicos sugere uma associação consistente entre o consumo de dietas à base de plantas e uma menor incidência de várias patologias crônicas. Há evidências convincentes de que a ingestão de compostos antioxidantes, como os compostos fenólicos, contidos alimentos de origem vegetal, desempenham um papel sinérgico e cumulativo na promoção da saúde (Tulipani et al., 2011).

As pequenas frutas estão dentre os alimentos mais ricos em compostos fenólicos e atraem muita atenção devido ao seu potencial para prevenir e tratar patologias de

homens e de animais. Uma grande variedade de fenólicos pode ser detectada em pequenas frutas, especialmente flavonois. Estes compostos são responsáveis pela alta capacidade de eliminação de radicais livres, medida por ensaios *in vitro* e *in vivo* (Veberic et al., 2014). Pertencentes ao grupo de pequenas frutas, estão o morango (*Fragaria x ananassa*), a amora-preta (*Rubus* spp.) e o mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade).

O morango, pertencente à família *Rosaceae*, é uma das frutas mais valorizadas devido ao conteúdo de vitaminas e minerais, e características sensoriais, como sabor e aroma. São ricos em vitamina C, fibras, minerais, e ácidos orgânicos. A amora-preta, também da família *Rosaceae*, é rica em açucares e ácidos orgânicos. Possuem coloração intensa, quase negra, devido à sua composição, destacando-se o elevado teor de antocianinas. O mirtilo pertence à família *Ericaceae*, e é fonte de carboidratos, vitaminas e minerais, além de ser uma boa fonte de fibras. É rico em compostos fenólicos, sendo que seus benefícios para a saúde humana receberam muita atenção nos últimos anos devido à presença destes compostos bioativos (Peinado, et al., 2012; Veberic et al., 2014; Shi et al., 2017).

Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar os genótipos de pequenas frutas morango, amora-preta e mirtilo quanto à composição química, atividade antioxidante frente à diferentes radicais livres e capacidade de inibição das enzimas digestivas alfa-glicosidase e alfa-amilase.

1.1 Hipóteses

- As características químicas das pequenas frutas morango, amora-preta e mirtilo variam significativamente de acordo com o ciclo produtivo analisado;
- Os extratos de morango, amora-preta e mirtilo capturam diferentes radicais livres, possuindo, portanto, atividade antioxidante.
- Os extratos de morango, amora-preta e mirtilo inibem distintamente as enzimas digestivas alfa-glicosidase e alfa-amilase.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Determinar as características químicas, composição fitoquímica, capacidade antioxidante frente à radicais livres e potencial de inibição das enzimas digestivas

alfa-glicosidase e alfa-amilase em pequenas frutas: dois genótipos de morango (*Fragaria x ananassa*), dois genótipos de amora-preta (*Rubus* spp.) e um genótipo de mirtilo (*Vaccinium ashei Reade*); em dois ciclos produtivos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os genótipos quanto composição química, incluindo compostos fenólicos totais, antocianinas totais e flavonoides totais.
- Determinar a atividade antioxidante dos genótipos pelos métodos de captura dos radicais DPPH, hidroxila e óxido nítrico.
- Determinar o potencial inibitório dos extratos dos genótipos sobre as enzimas digestivas alfa-glicosidase e alfa-amilase *in vitro.*

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pequenas frutas

Pequenas frutas representam um grupo muito diversificado, incluindo uma variedade de frutas vermelhas, azuis ou roxas de tamanho pequeno e altamente perecíveis. Também chamado de frutas moles, este grupo inclui uva, morango, groselha, amora, framboesa, mirtilo, araçá, pitanga, fisalis, guabiroba, butiá, uvaia, jambolão, jaboticaba, acerola e outras de menor importância econômica (por exemplo, jostaberry, amora silvestre, loganberry, e lingoberry) (Manganaris et al., 2014).

A relação do consumo de alimentos com potencial bioativo e promoção da saúde têm recebido destaque nos últimos anos, sendo alvo de inúmeras pesquisas e busca de informações pelos consumidores, principalmente em relação à legumes e frutas. O consumo destes pode ocasionar a prevenção de doenças crônicas, como por exemplo, a *Diabetes mellitus.* No grupo de frutas que têm sido alvo de diversas pesquisas por promover efeitos benéficos à saúde humana estão as pequenas frutas (Paredes-López et al., 2010).

As pequenas frutas são ricas em compostos fenólicos, estando entre os grupos com maiores teores dentre os alimentos de origem vegetal, e assim, atraindo muita atenção devido ao seu papel na promoção da saúde e na prevenção de doenças. As mesmas são particularmente fontes de flavonoides, compostos responsáveis pela alta capacidade de eliminação de radicais livres medida por ensaios in vitro e in vivo (Veberic et al., 2014). Dentre as pequenas frutas destacam-se o morango *(Fragaria*

xananassa), a amora-preta (*Rubus* spp.) e o mirtilo *(Vaccinium ashei* Reade*)*, frutas alvos deste estudo.

2.1.1 Morango (*Fragaria x ananassa*)

O morangueiro (*Fragaria x ananassa*), pertencente à família *Rosaceae*, representa um grupo pequeno de plantas, porém, de elevado valor econômico. O morangueiro é uma planta herbácea, rasteira, sendo caracterizada como uma cultura perene, cultivada anualmente. Possui reprodução assexuada, que se dá através de hastes rastejantes que crescem horizontalmente, e produzem, por meio de brotações denominadas estolões, mudas geneticamente idênticas à planta-mãe, com colheita das frutas aproximadamente 80 dias após o plantio. (Raven et al., 2007; Heide et al., 2013).

Os frutos de morango iniciam-se a partir de uma única inflorescência e são na verdade um agregado, composto de muitos ovários, cada um com um único óvulo. As sementes (aquênios), embutidas na epiderme do receptáculo inchado, são o verdadeiro fruto dessa espécie. O receptáculo é composto de uma medula interna, uma camada de córtex e uma camada epidérmica. As fitas fibrovasculares conectam os aquênios ao interior do receptáculo e fornecem nutrientes para os aquênios e células do parênquima circundante. Os aquênios têm aproximadamente 1 mm de comprimento e cada receptáculo pode conter algumas centenas deles. O aquênio maduro contém um pericarpo duro e relativamente espesso, uma testa fina, um endosperma de camada única e um pequeno embrião. A formação do embrião é completada 10 dias após a antese, e tem sido relatado armazenar proteína e gordura, mas sem amido. O crescimento dos receptáculos segue uma curva sigmóide simples ou dupla, dependendo da cultivar. É principalmente o resultado do aumento da célula; entretanto, a divisão celular representa de 15 % a 20 % do crescimento total (Fait et al., 2008).

O morango (Figura 1) é uma das frutas mais valorizadas, não só por causa de seu alto conteúdo de vitaminas e minerais, mas também por suas características sensoriais, como sabor e aroma. Com relação à composição nutricional e fitoquímica, os morangos contêm vitamina A, vitamina E e vitamina K, com destaque para o seu alto conteúdo de vitamina C (cerca de 60 mg / 100 g de fruta fresca) e, ainda que em menor proporção, uma fonte de várias outras vitaminas, como tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6. São considerados frutas muito perecíveis, com alto teor de água (Peinado

et al., 2012; Giampieri et al., 2015).

Além disso, outra característica nutricional significativa é a concentração de folato (24 µg / 100 g de fruta fresca). Também é uma fonte notável de manganês e uma boa fonte de iodo, magnésio, cobre, ferro e fósforo. Tanto os teores de fibra alimentar, como de frutose, podem contribuir para a regulação dos níveis de açúcar no sangue pela desaceleração da digestão, já que conteúdo de fibras pode controlar a ingestão de calorias por seu efeito saciante (Giampieri et al., 2015).

Além dos nutrientes tradicionais, os morangos estão entre as fontes alimentares mais ricas em compostos bioativos, representados principalmente por compostos fenólicos. Estes compostos são mais conhecidos por sua ação antioxidante e anti-inflamatória, e possuem direta e indiretamente atividade antimicrobiana, anti-hipertensivas, bem como a capacidade de inibir as atividades de alguns enzimas fisiológicas e receptores, prevenindo doenças relacionadas ao estresse oxidativo. O principal grupo de compostos fenólicos presentes em morangos são os flavonoides. Dentro do grupo de compostos fenólicos predominam as antocianinas, principalmente a pelargonidina, seguidas dos flavonóis (quercetina, kaempferol-3-malonilglucosídeo) e flavanois (catequinas e procianidinas). Também se encontram outros compostos fenólicos como os elagitaninos e ácidos fenólicos (derivados cafeicos e hidroxibenzóicos) (Wang et al., 1996; Giampieri et al., 2012; Giampieri et al., 2015).

Os morangos são consumidos *in natura* e em produtos processados, incluindo iogurtes, bebidas e geleias. Recentemente, extratos de morango também têm sido usados como ingredientes em alimentos com propriedades funcionais e suplementos dietéticos, combinados com outras frutas, vegetais e extratos de ervas (Giampieri et al., 2015).

Figura 1. Morango *in natura.*
Foto: Paulo Lanzetta.

2.1.2 Amora-preta (*Rubus* spp.)

A amora-preta *(Rubus* spp.**)** pertence à família *Rosaceae*, podendo ser encontrada cultivada ou não (frutas nativas). A amoreira-preta é uma espécie arbustiva de porte ereto ou rasteiro, que produz frutas agregadas, com cerca de 4 g a 7 g, de coloração negra, possuindo espinhos em suas plantas. A fruta da amoreira-preta é denominada de mini drupa ou drupete, na qual existe uma pequena semente, sendo que a sua junção forma o que é chamado de fruta agregada. O sabor da amora-preta é principalmente definido pelo equilíbrio entre os açúcares e os ácidos orgânicos. A cor intensa, quase negra, está associada a concentrações elevadas de antocianinas presentes em suas células (Antunes, 2002; Veberic et al., 2014).

Sua composição química varia de acordo com a cultivar, condições de crescimento, estágio de maturação e condições de colheita e pós-colheita. As amoras- pretas contêm minerais essenciais, como o cálcio, e elevado conteúdo de vitaminas, como a vitamina B e vitamina A. Além disso, são ricas em açúcares (glicose, frutose e sacarose), que varia de acordo com a maturação. As frutas contêm ácido málico e, embora em menores concentrações, já foram encontrados outros ácidos, como o ácido ascórbico, ácido chiquímico, fumárico e succínico, além de serem ricas em compostos fenólicos (Kaume et al., 2011).

As amoras-pretas (Figura 2) são uma rica fonte de polifenois, principalmente as antocianinas, flavonois, possuindo, também, níveis apreciáveis de ácidos

fenólicos. Os compostos fenólicos são afetados pela genética e grau de maturação das frutas. As antocianinas são os compostos fenólicos responsáveis pela variação na coloração, do vermelho ao roxo das frutas. As principais antocianinas da amora-preta são derivadas de cianidina com frações de glicose, rutinose, xilose e arabinose as quais incluem cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-galactosídeo, cianidina 3-xilosídeo, cianidina 3-dioxalil-glicosídeo, cianidina 3-rutinosídeo, cianidina 3-soforosídeo, cianidina 3-glicosilrutinosídeo, cianidina 3-arabinosídeo, malvidina 3-arabinosídeo, pelargonidina 3-glicosídeo dentre outras (Gu et al., 2004; Cho et al., 2005; Wu et al., 2005; Wu et al., 2006; Kaume et al., 2011).

Os compostos fenólicos encontrados nas cultivares de amora-preta são relatados na literatura como responsáveis pela promoção da saúde, possuindo propriedades anti-inflamatórias, antivirais, antiproliferativas e anticarcinogênicas, além de poderem ser utilizadas no tratamento e prevenção da obesidade e diabetes tipo 2 (Tsuda et al., 2003; Kaume et al., 2011; Chaves et al., 2018).

Figura 2. Amora-preta *in natura.*

Foto: Paulo Lanzetta

2.1.3 Mirtilo *(Vaccinium ashei Reade)*

Os mirtilos (*V. ashei* Reade) pertencem à família *Ericaceae*, sendo originário da Europa e América do Norte. É uma planta caducifólia, tem porte arbustivo ou rasteiro, produz de três a cinco quilos de frutas por planta, sendo a fruta do tipo baga, de cor

azul intensa, recoberto de pruína (cera que recobre a fruta), com diâmetro entre 1,5 cm a 2,5 cm e 1,5 g a 4 g de massa (Routray & Orsat, 2011; Momoli, 2018).

O mirtilo (Figura 3) é uma fruta nutritiva, pois é fonte de carboidratos, vitaminas e minerais, além de serem uma boa fonte de fibras alimentares, que constituem 3,0 % a 3,5 % da massa da fruta. Além disso, o mirtilo tem elevado conteúdo de vários compostos bioativos, principalmente os compostos fenólicos. Os componentes bioativos contidos no mirtilo são ácido ascórbico, flavonóis (incluindo a quercetina e a miricetina), ácidos hidroxicinâmicos (incluindo ácidos cafeico, ácidos ferúlicos e ácidos cumáricos), e ácidos hidroxibenzóicos (incluindo o ácido gálico). (Michalska & Lysiak, 2015; Shi et al., 2017).

Estes compostos bioativos possuem capacidade antioxidante, que proporcionam uma série de funcionalidades, dentre elas a atuação como sequestrantes de radicais livres, decompositores de peróxido, inibidores de enzimas, além de retardar ou prevenir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, inibindo a iniciação ou a propagação de reações em cadeia oxidativas. Evidências crescentes sugerem que seu consumo ajuda a prevenir o câncer, doenças crônicas, e também pode desempenhar um papel preventivo em defeitos congênitos, formação de catarata, hipertensão, asma, diverticulose, obesidade e diabetes (Wang et al., 2012a; Wu et al., 2017).

Figura 3. Mirtilo *in natura.*

Foto: Paulo Lanzetta

2.2 Pequenas frutas e potencial antidiabético

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que existem 346 milhões de pessoas em todo o mundo que sofrem de diabetes, sendo que este número duplicará até 2030. A diabetes é uma doença crônica não-transmissível, sendo que a maior incidência é a de diabetes do tipo 2, que é ocasionada por fatores relacionados ao estilo de vida, incluindo tabagismo, obesidade, dieta pobre e sedentarismo. Por se tratar de uma doença dependente destes hábitos, é que a *Diabetes mellitus* tipo 2 é a forma que possui esta previsão de aumento em alguns anos. Dietas ricas em frutas e hortaliças têm sido associadas à redução da incidência de DM2, e vários estudos sugerem que dietas ricas em compostos bioativos contribuem na manutenção do índice glicêmico em níveis normais, evitando assim a ocorrência de DM2 (Boath et al., 2012).

Moléculas bioativas de frutas podem agir como inibidoras de enzimas digestivas, e no caso da DM2, a inibição destas enzimas, principalmente a α-glicosidase e α-amilase, pode ser uma forma de tratamento e prevenção da doença. Estas enzimas atuam na absorção da glicose nos enterócitos através de transportadores específicos, hidrolisando os carboidratos, para que estes sejam absorvidos na corrente sanguínea. A alfa-amilase é responsável por hidrolisar as ligações glicosídicas α-1,4 da amilose e da amilopectina presentes no amido, e a alfa-glicosidase é responsável pela hidrólise dos dissacarídeos, liberando duas moléculas de glicose para serem absorvidas na corrente sanguínea, como demonstrado na figura 4 (Yamagishi et al., 2009; Williamson, 2013).

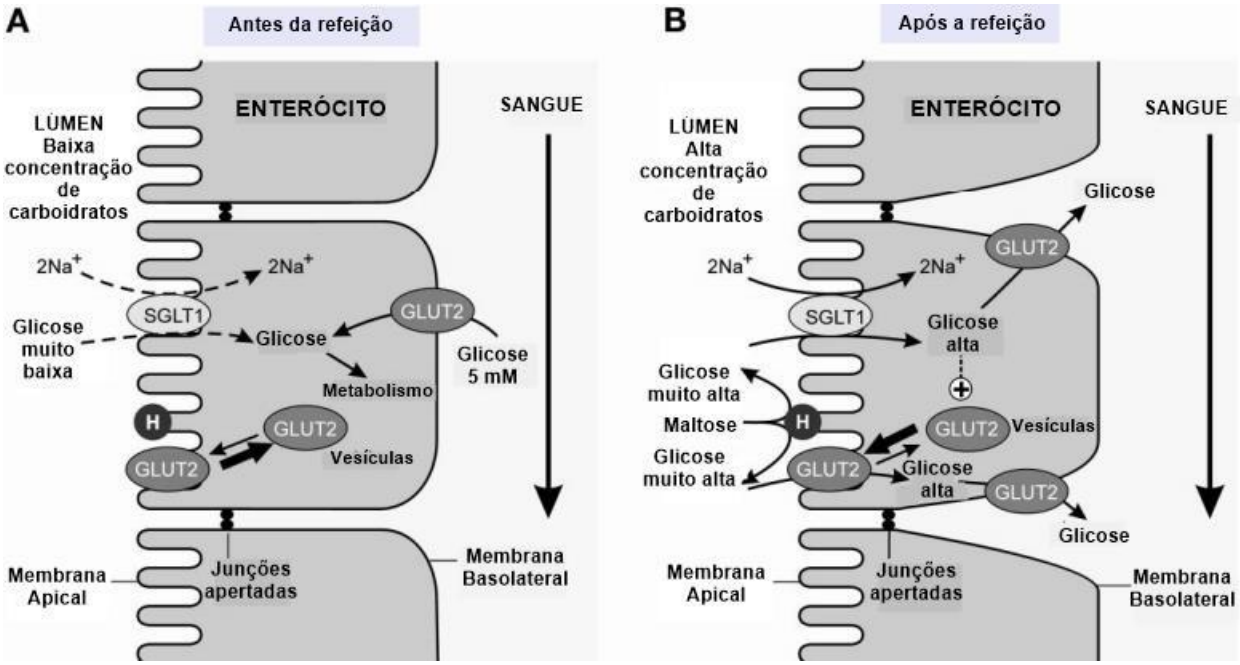

Figura 4. Regulação da absorção da glicose antes e após a refeição H – hidrolase (α-glicosidase)

Fonte: adaptada de Kellet; Brot-Laroche, 2005.

Neste sentido, as pequenas frutas podem ser uma alternativa no tratamento e prevenção da DM2, visto que as mesmas são ricas em polifenois. Os benefícios à saúde associados ao consumo de polifenois se dão, principalmente, pelo fato dos mesmos possuírem atividade antioxidante. Estes compostos fornecem proteção contra os danos causados pelos radicais livres ao DNA, membranas e componentes celulares, que estão envolvidos na progressão da diabetes. Além disso, os compostos fenólicos também atuam no bloqueio de enzimas específicas, que ocorre devido à capacidade das estruturas fenólicas se combinarem com enzimas digestivas, proteínas e outros polímeros (carboidratos e pectinas) formando complexos estáveis e impedindo a sua ação (Valko et al., 2007; Boath et al., 2012).

Existem evidências de que os polifenois podem modular a disponibilidade de nutrientes através da inibição de enzimas digestivas envolvidas na quebra de lipídios e amido, o que poderia influenciar no combate à obesidade e controle glicêmico (McDougall et al., 2008; McDougall et al., 2009).

Extratos ricos em polifenois de pequenas frutas, inibem as enzimas alfa-amilase e α-glicosidase, *in vitro* e em *in vivo* (Boath et al., 2012). Estas enzimas, no organismo humano, são inibidas utilizando medicamentos como a acarbose, que é prescrito para

o controle da hiperglicemia pós-prandial, que é caracterizada pelo aumento excessivo na concentração de glicose no sangue após as refeições.

Grussu et al. (2011) confirmaram que extratos de pequenas frutas, ricos em polifenóis, inibem a alfa-amilase *in vitro*, e que o consumo destas frutas poderia proporcionar uma redução na dependência por medicamentos para tratamento da DM2. Boath et al. (2012) avaliaram extratos de diferentes pequenas frutas, e obtiveram a inibição da alfa- glicosidase, demonstrando que algumas destas frutas foram tão eficazes quanto o medicamento acarbose.

Cheplick et al., (2010) avaliaram atividade de extratos de diferentes cultivares de morango frente às enzimas alfa-amilase e alfa -glicosidase, encontrando uma inibição satisfatória para a alfa -glicosidase e baixa inibição para a alfa -amilase. Os autores correlacionaram a atividade enzimática com o conteúdo fenólico encontrado nas frutas, e sugerem que a ingestão dos mesmos pode ser efetiva no tratamento da DM2 e também da hipertensão. Pallavi et al. (2010) em seu estudo que avaliou a atividade de extratos aquosos de morango frente a estas enzimas observou um comportamento semelhante, ou seja, a inibição foi mais efetiva frente à alfa-glicosidase, com um IC_{50} de 76,83 ± 0,93 µg / mL do que para a α-amilase 86,47 ± 1,12 µg / mL.

Wang et al., (2012b) avaliou diferentes genótipos de mirtilo quanto ao teor de fitoquímicos, atividade antioxidante e atividade frente à enzima alfaglicosidase, observando que a casca possuía níveis mais elevados de antocianinas totais, fenólicos totais, capacidade antioxidante e atividade inibidora desta enzima do que a polpa, em todas as amostras testadas, demonstrando a importância do consumo da fruta inteira para a promoção da saúde. Wu et al. (2017) avaliou diferentes cultivares de mirtilo quanto ao teor de compostos bioativos e atividade antioxidante e frente à enzima α-glicosidase, observando diferentes teores de inibição da enzima, e notando uma forte correlação entre a atividade antioxidante e o teor de antocianinas.

Diversos estudos, de diferentes continentes do mundo, que evidenciam a capacidade das pequenas frutas na inibição das enzimas alfa-glicosidase e alfa-amilase, porém, ainda há algumas lacunas no que diz respeito à inibição destas enzimas por algumas pequenas frutas, como por exemplo, as produzidas e/ou provenientes do Brasil. Sabe-se que a composição química das frutas, e consequentemente seu potencial bioativo, pode variar de acordo com as condições edafoclimáticas e características genéticas da frutífera, entretanto, pouco se sabe sobre a significância destas variações. Assim, assume-se a importância de estudos

destinados a caracterização dos componentes bioativos em pequenas frutas produzidas no Brasil, de diferentes genótipos, em diferentes condições edafoclimáticas, especialmente quando se considera a ocorrência de doenças crônicas passíveis de serem mitigadas pela ingestão de pequenas frutas ou de seus componentes bioativos. Pequenas frutas como a amora-preta, mirtilo e morango, que são amplamente consumidas no país serão avaliadas neste estudo, e será determinado se as mesmas são capazes de inibir estas enzimas, e assim, contribuir no tratamento e prevenção da DM2.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Boath, A. S., Stewart, D., & McDougall, G. J. Berry components inhibit α-glucosidase in vitro: Synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry. **Food Chemistry,** 135(3), 929–936, 2012.

Chaves, V. C., Boff, L., Vizzotto, M., Calvete, E., Reginatto, F. H., & Simões, C. M. (2018).. Berries grown in Brazil: anthocyanin profiles and biological properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 98(11), 4331–4338. 2018.

Cheng, A.Y.Y.; Josse, R.G. Intestinal absorption inhibitors for type 2 diabetes mellitus: prevention and treatment. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 1, n. 2, p. 201-206, 2004.Cheplick, S., Kwon, Y.-I., Bhowmik, P., & Shetty, K. Phenolic-linked variation in strawberry cultivars for potential dietary management of hyperglycemia and related complications of hypertension. **Bioresource Technology**, 101(1), 404–413, 2010.

Cho, M. J., Howard, L. R., Prior, R. L., & Clark, J. R. Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 85(13), 2149–2158, 2005.

Cobas, R. A. Gomes, M. B. Diabetes Mellitus**. Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto,** UERJ, ano 9, 2010.

Fait, A., Hanhineva, K., Beleggia, R., Dai, N., Rogachev, I., Nikiforova, V. J., Fernie, A. R., & Aharoni, A. Reconfiguration of the Achene and Receptacle Metabolic Networks during Strawberry Fruit Development. *Plant Physiology, 148*(2), 730, 2008.

Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, 28(1), 9–19, 2012.

Giampieri, F., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparrini, M., Alvarez-Suarez, J. M., Afrin, S., Bompadre, S.,...Battino, M. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. **Food & Function**, 6(5), 1386–1398. doi:10.1039/c5fo00147a, 2015.

Grussu, D., Stewart, D., & McDougall, G. J. Berry polyphenols inhibit a-amylase in vitro: Identifying active components in rowanberry and raspberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 2324–2331, 2011.

Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., … Prior, R. L. Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption. **The Journal of Nutrition,** 134(3), 613–617, 2004.

Heide, O. M., Stavang, J. A., & Sønsteby, A. Physiology and genetics of flowering in cultivated and wild strawberries – a review. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology,** 88(1), 1–18, 2013.

Kaume, L., Howard, L. R., & Devareddy, L. The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60(23), 5716–5727, 2011.

Kellett, G. L., & Brot-Laroche, E. Apical GLUT2: A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption. **Diabetes**, 54(10), 3056–3062, 2005.

Manganaris, G. A., Goulas, V., Vicente, A. R., & Terry, L. A. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture***, 94*(5), 825-833, 2014.

McDougall, G. J., Kulkarni, N. N., & Stewart, D. Current developments on the inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **Biofactors**, 34, 73–80, 2008.

McDougall, G. J., Kulkarni, N. N., & Stewart, D. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. **Food Chemistry**, 115, 193–199, 2009.

Michalska, A., & Lysiak, G. Bioactive compounds of blueberries: Post-harvest factors influencing the nutritional value of products. **International Journal of Molecular Sciences**, 16(8), 18642–18663, 2015

Momoli, Lygia Werlang. **Crescimento e desenvolvimento de plantas de Mirtilo, cultivar clímax, inoculadas com Azospirillum Brasiliense**. 2018, 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, 2018.

De Oliveira, P. P., Fachin, S. M., Tozatti, J., Ferreira, M. C., & Marinheiro, L. P. F. Análise comparativa do risco de quedas entre pacientes com e sem diabetes mellitus tipo 2. **Revista da Associação Médica Brasileira**, *58*(2), 234-239, 2012.

Pallavi, M., Rani, H., Kuvalekar, A., & Ranjekar, P. Antiglycation, antioxidant and antidiabetic activity of mature Strawberry (Fragaria× ananassa) fruits**. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**. v. 4 issue 4, 2013.

Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Pérez, M., & Hernández-Pérez, T. Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life—A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, 65(3), 299–308, 2010.

Peinado, I., Rosa, E., Heredia, A., & Andrés, A. Rheological characteristics of healthy sugar substituted spreadable strawberry product. **Journal of Food Engineering**, 113(3), 365–373, 2012.

Routray, W., & Orsat, V. Blueberries and Their Anthocyanins: Factors Affecting Biosynthesis and Properties. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 10(6), 303–320, 2011.

Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., Silveira, D. α-Amylase Inhibitors: A review of raw materual and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 15 (1) 141-183, 2012.

Shi, M., Loftus, H., McAinch, A. J., & Su, X. Q. Blueberry as a source of bioactive compounds for the treatment of obesity, type 2 diabetes and chronic inflammation. **Journal of Functional Foods**, 30, 16–29, 2017.

Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., & Osawa, T. Dietary Cyanidin 3-O-β-D-Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice. **The Journal of Nutrition**, 133(7), 2125–2130, 2003.

Tulipani, S., Marzban, G., Herndl, A., Laimer, M., Mezzetti, B., & Battino, M. Influence of environmental and genetic factors on health-related compounds in strawberry. **Food Chemistry**, 124(3), 906–913, 2011.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; & Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

Veberic, R., Stampar, F., Schmitzer, V., Cunja, V., Zupan, A., Koron, D., & Mikulic-Petkovsek, M. Changes in the Contents of Anthocyanins and Other Compounds in Blackberry Fruits Due to Freezing and Long-Term Frozen Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(29), 6926–6935, 2014.

Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. Total Antioxidant Capacity of Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44(3), 701–705, 1996.

Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(2), 304–309, 1997.

Wang, S. Y., Chen, H., Camp, M. J., & Ehlenfeldt, M. K. Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (Vaccinium ashei Reade). **Food Chemistry**, 132(2), 855–864, 2012a.

Wang, S. Y., Camp, M. J., & Ehlenfeldt, M. K. Antioxidant capacity and α-glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (Vaccinium spp.) cultivars. **Food Chemistry**, 132(4), 1759–1768, 2012b.

Wu, X., & Prior, R. L. Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(7), 2589–2599, 2005.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(11), 4069–4075, 2006.

Wu, Y., Zhou, Q., Chen, X., Li, X., Wang, Y., & Zhang, J. Comparison and screening of bioactive phenolic compounds in different blueberry cultivars: Evaluation of anti-oxidation and α-glucosidase inhibition effect. **Food Research International**, 100, 312–324, 2017.

Yamagishi, S; Matsui, T; Ueda, S; Fukami, K; Okuda, S. Clinical utility of acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor in cardiometabolic disorders. **Current Drug Metabolism.** n. 10, p. 159–163, 2009.

CAPÍTULO 1

Projeto de Pesquisa

Potencial inibitório de glicosidases em genótipos de morango *(Fragaria x ananassa)*, amora-preta *(Rubus spp*.) e mirtilo *(Vaccinium ashei Reade)*

Taiane Mota Camargo

Pelotas, 2019

Caracterização do problema

O *Diabetes mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Nas últimas décadas, o DM tem se tornado um sério e crescente problema de saúde pública, devido ao aumento de sua prevalência (Cobas et al., 2010). A DM é classificada como uma doença crônica.

Atualmente, sabe-se que um denominador comum na patogênese da maioria das doenças crônicas é o envolvimento do estresse oxidativo. Paralelamente, um crescente número de estudos epidemiológicos sugere uma associação consistente entre o consumo de dietas à base de plantas e frutas e uma menor incidência de várias patologias crônicas. (Tulipani et al., 2011).

Os inibidores da α-glucosidase, enzimas responsáveis pelo metabolismo de glicoconjugados, são exemplos de antidiabéticos orais, que atuam no retardo na absorção da glicose a partir do intestino delgado, reduzindo a glicemia pós-prandial. A acarbose é um exemplo de inibidor da α-glucosidase, pois diminui as chances de pacientes com problemas de intolerância à glicose tornarem-se diabéticos (Cheng et al., 2004). Em contraponto, o uso deste medicamento causa efeitos adversos como flatulência, dor abdominal e diarreia durante sua administração (Weinert et al., 2015). Assim, o estudo de compostos presentes naturalmente em frutas, nos últimos anos, está sendo bastante estudado, visando um efeito antidiabético sem reações adversas aos usuários deste tipo de medicamento.

As pequenas frutas são muitas vezes a fonte mais rica de fenólicos entre frutas e vegetais e atraem muita atenção devido ao seu papel positivo na saúde humana e na prevenção de doenças. Uma grande variedade de fenólicos pode ser detectada em espécies de pequenas frutas, que são particularmente abundantes em flavonóis. Esses compostos são responsáveis pela alta capacidade de eliminação de radicais livres medida por ensaios in vitro e in vivo (Veberic et al., 2014). Pertencentes ao grupo de pequenas frutas, estão o morango (*Fragaria x ananassa*), a amora-preta (*Rubus* spp.) e o mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade).

Os compostos fenólicos, compostos estes presentes nos três frutos anteriormente citados, representam um grupo muito diversificado de fitoquímicos, sendo os flavonóides, taninos e ácidos fenólicos os grupos mais representativos desta classe (Manach et al., 2004). Estes compostos possuem ação antioxidante, capturando radicais livres (Shahidi et al., 1992), e atuam na redução da oxidação lipídica em

tecidos vegetais e animais, e, quando inserido na alimentação humana, reduzem o risco de desenvolvimento de doenças como arteriosclerose, câncer, diabetes, doenças do envelhecimento, entre outras (Ramarathnam et al., 1995; Degaspari et al., 2004). Assim, objetiva-se verificar a capacidade de inibição do extrato bruto (etanólico) dos genótipos de pequenas frutas de morango (*Fragaria x ananassa*), amora-preta (*Rubus* spp.) e mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) frente às enzimas digestivas, e atividade antioxidante, bem como realizar a caracterização química das mesmas.

Objetivos e Metas

- Caracterizar os genótipos quanto composição química, incluindo compostos fenólicos totais, antocianinas totais e flavonoides totais e compostos fenólicos individuais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
- Determinar a atividade antioxidante dos genótipos pelos métodos de captura dos radicais DPPH, hidroxila e óxido nítrico.
- Determinar o potencial inibitório dos extratos dos genótipos sobre as enzimas digestivas α-glicosidase e α-amilase *in vitro.*

Metodologia

Para a caractrização química serão realizadas as análises de pH, acidez, sólidos solúveis, umidade, cinzas, fibras, lipídeos. A análise de compostos fenólicos individuais será realizada por Cromatografia líquida de alta eficiência, e as análises de compostos fenólicos totais, antocianinas totais, atividades antioxidantes, e atividade enzimática serão realizadas por métodos espectrofotométricos. As metodologias utilizadas sã descritas no capítulo 2, item 2.

Resultados e impactos esperados

- Obter uma caracterização ampla das pequenas frutas, a fim de verificar sua composição química, incluindo compostos fenólicos individuais presentes nestas frutas;
- Avaliar o potencial das pequenas frutas morango, amora-preta e mirtilo na inibição das enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase, podendo, assim, reforçar o efeito benéfico das mesmas frente DM2;
- Mostrar que o morango, a amora-preta e o mirtilo possuem atividade antioxidante frente à diferentes radicais livres;

- Promover o consumo das pequenas frutas, mostrando que as mesmas são ricas em compostos bioativos e ocasionam a promoção da saúde.

Delineamento experimental

O delineamento experimental é descrito na Tabela 1.

Variáveis independentes		Variáveis dependentes
		pH
		Acidez
	Camarosa	Sólidos solúveis
	Acesso 2011-6011	Umidade
Ciclo produtivo		Cinzas
2016		Fibras
		Lipídeos
		Compostos fenólicos totais
	Tupy	Antocianinas Totais
	Xingú	Flavonoides Totais
Ciclo produtivo		Compostos fenólicos
2017		individuaiS
		Atividade antioxidante –
		DPPH
	O´Neal	Atividade antioxidante –
		Óxido nítrico
		Atividade antioxidante –
		Hidroxila
		Inibição da alfa-amilase
		Inibição da alfa-glicosidase

Referências Bibliográficas

Cheng, A.Y.Y.; Josse, R.G. Intestinal absorption inhibitors for type 2 diabetes mellitus: prevention and treatment. Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies, v. 1, n. 2, p. 201- 206, 2004.

Cobas, R. A. Gomes, M. B. **Diabetes Mellitus.** Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ, ano 9, 2010.

Degáspari, C.H.; Waszczynskyj, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

Ramarathnam, N.; Osawa, T.; Ochi, H.; & Kawakishi, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 3, p. 75-82, 1995.

Shahidi, F.; Janitha, P. K.; Wanasundara, P. D.; Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

Tulipani, S.; Marzban, G.; Herndl, A.; Laimer, M.; Mezzetti, B.; Battino, M. Influence of environmental and genetic factors on health-related compounds in strawberry. **Food Chemistry**, v. 124, p. 906-913, 2011.

Veberic, R.; Stampar, F.; Schmitzer, V.; Cunja, V.; Zupan, A.; Koron, D.; Petkovsek, M. M. Changes in the Contents of Anthocyanins and Other Compounds in Blackberry Fruits Due to Freezing and Long-Term Frozen Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62, p. 6926−6935, 2014.

Weinert, L. S; Camargo, E. G; Silveiro, S. P. Tratamento Medicamentoso da Hiperglicemia no Diabetes Mellitus Tipo 2. **Clinical & Biomedical Research**, v. 30, n. 4, 2015.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1: Morango, amora-preta e mirtilo: uma revisão sobre composição e bioatividade

Submissão realizada à revista científica **Food Chemistry**

(Periódico A1 para a área de Ciência e Tecnologia de Alimentos –

Fator de Impacto 4.946)

Morango, amora-preta e mirtilo: uma revisão sobre composição e bioatividade

Taiane Mota CAMARGO[1,2]*, Marjana RADÜNZ[2], Fabiana Roos NORA[2], Gabriel DALMAZO[2], Cesar Valmor ROMBALDI[2], Márcia VIZZOTTO[1], Leonardo NORA[2]

[1] Embrapa Clima Temperado, BR 392, KM 78, C. P. 403, CEP 96010-971, Pelotas-RS, Brasil.

[2] Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Avenida Eliseu Maciel, S/N, CEP 96160-000, Capão do Leão, RS, Brasil.

* Corresponding author. Tel.: +55 53 98413-9182

* E-mail address: taianemcamargo@gmail.com

Resumo

As pequenas frutas, como morango, amora-preta e mirtilo são amplamente consumidas no mundo. Elas apresentam em sua composição compostos fenólicos, terpenos, antocianinas, vitaminas A, C, E e do complexo B, minerais como cálcio, fósforo e potássio que apresentam diversos benefícios a saúde humana. Estudos relatam que estas frutas possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, anti-envelhecimento, antidiabética, antilipidemica e antimicrobiana. Nesta revisão, busca-se avaliar os efeitos do consumo de compostos bioativos presentes em morango, amora-preta e mirtilo na saúde humana, reportando estudos *in vitro*, *in vivo* e epidemiológicos.

1. Introdução

A relação entre dieta e saúde ocasionou uma busca por informações sobre os compostos bioativos existentes em frutas e vegetais, já que uma alimentação rica nestes compostos pode prevenir inúmeras doenças crônicas não transmissíveis. As pequenas frutas, como morango, amora-preta e mirtilo, são amplamente consumidas. Acredita-se que a presença de uma ampla variedade de compostos bioativos nestas frutas traz benefícios à saúde humana frente a obesidade, câncer, doenças cardiovasculares e degenerativas (Juranić e Žižak, 2005; Zafra-Stone, Yasmin, Bagchi, Chatterjee, Vinson e Bagchi, 2007; Kapur, Saridas, Çeliktopuz, Kafkas e Kargi, 2018).

As pequenas frutas podem ser consumidas *in natura* ou processadas. Entretanto, há uma tendência crescente no uso de extratos de pequenas frutas como ingrediente em alimentos funcionais, dietéticos, suplementos, frutas, hortaliças, e em extratos de plantas; principalmente pela riqueza em compostos fenólicos (Paredes-López, Cervantes-Ceja, Vigna-Pérez e Hérnandez-Pérez, 2010; Nile e Park, 2014).

Estas frutas possuem elevados conteúdos de polifenois, vitaminas, minerais e fibras. Os polifenois compreendem uma ampla variedade de compostos, divididos em diversas classes, como os ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, antocianinas, proantocianidinas, flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, isoflavonas, estilbenos e lignanas, todas com atividade antioxidante e atuantes na eliminação de radicais livres no organismo. Acredita-se que os efeitos sinérgicos resultantes de múltiplos compostos bioativos encontrados em pequenas frutas sejam responsáveis por sua ampla gama de propriedades biológicas observadas, sendo muito inferior o efeito de compostos isolados (Moyer, Hummer, Finn, Frei e Wrolstad, 2002; Manach, Scalbert, Morand, Rémésy e Jiménez, 2004; Seeram, 2008).

Estudos demonstram que as pequenas frutas possuem atividade anticancerígena, através de mecanismos de ação complementares e sobrepostos, incluindo a indução de enzimas metabolizantes, modulação da expressão gênica e seus efeitos na proliferação celular, apoptose e vias de sinalização subcelular; propriedades antioxidantes, através da captura de radicais livres; e propriedades antiproliferativas. Pequenas frutas como morango e amora-preta foram identificadas como fontes de compostos fenólicos, como o ácido gálico e elágico, que tem potencial quimiopreventivo para o câncer (Meyskens, 2005; Seeram, 2006a; Zhao, 2008; Seeram, 2008; Pereira, Vinholes, Franzon, Dalmazo, Vizzotto e Nora, 2018)

Os compostos bioativos, principalmente os compostos fenólicos, incluindo flavonoides, taninos e ácidos fenólicos, receberam muita atenção nos últimos anos, devido aos seus efeitos benéficos à saúde, principalmente quando os mesmos são obtidos, na dieta, de fontes naturais como pequenas frutas. Baseado no exposto, o objetivo do presente trabalho é realizar uma revisão acerca das atividades biológicas e composição das pequenas frutas mais consumidas, como morango, mirtilo e amora-preta.

2. Composição química

2.1 Composição nutricional

Um dos fatores mais importantes para a preferência do consumidor é a doçura da fruta, que é determinada pela qualidade e quantidade de açúcares. A frutose é considerada 1,8 vezes mais doce que a sacarose, mas a doçura da glicose é de apenas 0,6 vezes de sacarose (Kapur et al., 2018). São excelentes fonte s de fbras, proteínas, dentr outros nutientes (Tabela 1).

Tabela 1. Carboidratos, fibras, proteínas, lipídeos e conteúdo de açúcares solúveis em morango, amora-preta e mirtilo.

Componente	Morango	Amora -preta	Mirtilo	Referências
Carboidratos	7,68	9,61	14,49	Mazza, 2005; Kaume, Howard e Devareddy, 2011; Giampieri, Tulipani, Alvarez-Soarez, Quiles, Mezzetti e Battino, 2012.
Fibras	2,00	5,30	2,40	Mazza, 2005; Kaume et al., 2011; Giampieri et al., 2012.
Proteínas	0,67	1,39	0,74	Mazza, 2005; Kaume et al., 2011; Giampieri et al., 2012.
Lipídeos	0,30	0,49	0,33	Mazza, 2005; Kaume et al., 2011; Giampieri et al., 2012.
Frutose	2,44	2,40	4,98	Mazza, 2005; Kaume et al., 2011; Giampieri et al., 2012.
Glicose	1,99	2,32	4,88	Mazza, 2005; Kaume et al., 2011; Giampieri et al., 2012.
Sacarose	0,47	0,07	0,11	Mazza, 2005; Kaume et al., 2011; Giampieri et al., 2012.

As pequenas frutas possuem grande quantidade de vitaminas A, C e E e do complexo B (Tabela 2) que atuam sobre o sistema imunológico de forma positiva promovendo a redução do processo inflamatório. Também são consideradas antioxidantes pois auxiliam no combate dos efeitos do estresse oxidativo e de doenças crônicas, não transmissíveis como doenças cardíacas e diabetes.

A concentração de vitamina C nas frutas é afetada por vários fatores, incluindo espécie, cultivar, cultivo, condições climáticas, maturação, região, e tempo de armazenamento (Mazza, 2005; Kaume et al., 2011; Giampieri et al., 2012).

O morango é a fruta com maiores concentrações de vitamina C reportado na literatura, possuindo 58,8 mg em 100 g de fruto fresco, possuindo também vitaminas como as do Complexo B, vitamina A e vitamina K (Pantelidis, Vasilakakis, Manganaris e Diamantidis, 2007; Giampieri et al., 2012). As amoras pretas também possuem concentrações significativas de vitamina C (21 mg em 100 g de fruta fresca), além de serem boas fontes de vitaminas A e K (64,2 µg e 19,8 µg em 100 g de fruta fresca, respectivamente) (Kaume et al., 2011). Os mirtilos também possuem em maior quantidade a vitamina C (9,7 mg em 100g de fruta fresca), além de possuíres ainda algumas vitaminas do complexo B.

Tabela 2. Teor de vitaminas em morango, amora-preta e mirtilo.

Vitaminas (100g de fruto fresco)	Morango	Amora-preta	Mirtilo	Referências
Vitamina C (mg)	58,800	21,000	9,700	Mazza (2005); Kaume et al. (2011);
Tiamina (mg)	0,024	0,020	0,037	Giampieri et al. (2012), Mazza (2005); Kaume et al. (2011);
Riboflavina (mg)	0,022	0,030	0,041	Giampieri et al. (2012), Mazza (2005); Kaume et al. (2011);
Vitamina B5 (mg)	0,125	0,280	0,124	Giampieri et al. (2012), Mazza (2005); Kaume et al. (2011);
Vitamina B6 (mg)	0,047	0,030	0,052	Giampieri et al. (2012), Mazza (2005); Kaume et al. (2011);
Folato (µg)	24,000	25,000	6,000	Giampieri et al. (2012), Mazza (2005); Kaume et al. (2011);
Colina (mg)	5,700	ND	ND	Giampieri et al. (2012), Mazza (2005); Kaume et al. (2011);
Betaina (mg)	0,200	ND	ND	Giampieri et al. (2012), Mazza (2005); Kaume et al. (2011);
Vitamina A (µg)	1,000	64,200	16,200	Giampieri et al. (2012), Mazza (2005); Kaume et al. (2011);
Vitamina E (mg)	0,290	1,170	0,570	Giampieri et al. (2012), Mazza (2005); Kaume et al. (2011);
β-tocoferol (mg)	0,010	0,040	ND	Giampieri et al. (2012), Mazza (2005); Kaume et al. (2011);
γ-tocoferol (mg)	0,080	1,340	ND	Giampieri et al. (2012), Mazza (2005); Kaume et al. (2011);
Vitamina K,(µg)	2,200	19,800	ND	Giampieri et al. (2012), Mazza (2005); Kaume et al. (2011);
				Giampieri et al. (2012),

* ND- não detectado.

Os minerais são elementos essenciais para o organismo humano, por isso devem ser obtidos naturalmente através dos alimentos. Morangos são ricos em minerais (Tabela 3) como cálcio, fósforo e um alto teor de potássio, nas concentrações de 16 mg, 24 mg e 153 mg em 100 g de fruta fresca, respectivamente. Possuem também, em menores concentrações, os minerais zinco (0,14 mg em 100 g), sódio (1 mg em 100 g), e selênio (0,004 mg em 100 g) (Giampieri et al., 2012). As amoras- pretas possuem concentrações significativas de potássio (162 mg em 100g) e cálcio (29 mg em 100g), e fósforo (12,3 mg em 100g) (Kaume et al., 2011). Os mirtilos, no que diz respeito à concentração de minerais possui teores menores que às demais frutas, com destaque para o teor de cálcio e potássio, com 21,2 mg e 68,4 mg em 100 g de fruta fresca, respectivamente (Bushway, Gann, Cook e Bushway, 1983).

Tabela 3. Teor de minerais em morango, amora-preta e mirtilo.

Minerais (100g de fruta fresca)	Morango	Amora-preta	Mirtilo	Referências
Cálcio (mg)	16,00	29,00	21,20	Bushway et al. (1983), Kaume et al. (2011); Giampieri et al. (2012)
Ferro (mg)	0,41	0,62	0,31	Bushway et al. (1983), Kaume et al. (2011); Giampieri et al. (2012)
Magnésio (mg)	13,00	20,00	8,15	Bushway et al. (1983), Kaume et al. (2011); Giampieri et al. (2012)
Fósforo (mg)	24,00	22,00	12,30	Bushway et al. (1983), Kaume et al. (2011); Giampieri et al. (2012)
Potássio (mg)	153,00	162,00	68,40	Bushway et al. (1983), Kaume et al. (2011); Giampieri et al. (2012)
Sódio (mg)	1,00	1,00	0,14	Bushway et al. (1983), Kaume et al. (2011); Giampieri et al. (2012)
Zinco (mg)	0,14	0,53	0,10	Bushway et al. (1983), Kaume et al. (2011); Giampieri et al. (2012)
Cobre (mg)	0,048	0,17	0,04	Bushway et al. (1983), Kaume et al. (2011); Giampieri et al. (2012)
Manganês (mg)	0,386	0,65	2,56	Bushway et al. (1983), Kaume et al. (2011); Giampieri et al. (2012)
Selênio (mg)	0,004	0,400	0,00004	Bushway et al. (1983), Kaume et al. (2011); Giampieri et al. (2012), Zhang et al. (2014)

3. Fitoquímicos

3.1 Compostos voláteis

Os compostos voláteis são substâncias as quais atribuímos o aroma dos alimentos. Nas pequenas frutas os aromas são extremamente desejáveis, pois afetam a aceitabilidade do produto, entretanto a composição destes pode ser afetada pela cultivar, tipo de solo, clima, maturação e sistema de produção (Forney, Kalt e Jordan, 2000; Krolow, Schwengber e Ferri, 2007).

Em morangos são identificados 131 diferentes compostos responsáveis pelo aroma característico da fruta, tais como ésteres que conferem notas frutadas e florais e correspondem entre 25% a 90% dos voláteis totais em frutas maduras frescas. Outras classes de compostos, como os aldeídos e furanonas compreendem até 50% de voláteis de morango, os álcoois respondem a até 35% dos voláteis, mas normalmente contribuem pouco para o aroma do morango e por fim compostos terpenos compreendem a <10% de voláteis de morango (Forney et al., 2000). Ayala-Zavala, Wang, Wang e Aguilar (2004) identificaram compostos como acetato de metila, hexanoato de metila, metanoato de metila, hexanoato de etila, butanoato de etila, acetato de butila e acetato de hexila, e observou que estes são afetados pelo tempo e pela temperatura de armazenamento.

O trabalho de Du, Finn e Qian (2010) identificou aproximadamente 70 compostos voláteis em diferentes cultivares de amoras-pretas, incluindo ácidos, como o ácido butanoico, ácido hexanóico, e ácido 2-metilbutanóico. A presença de furanonas como o furaneol, e mesifurano e de terpenóides como o linalol, alfa-terpineol, óxido de cis-linalol, alfa-terpineol e geraniol, também foram observados. Os álcoois foram uma das classes voláteis mais predominantes nas cultivares, com destaque para o 2-heptanol, hexanol, trans-2-hexenol e álcool benzílico. No geral, os níveis de ésteres e lactonas encontrados nas cultivares avaliadas foram muito baixos.

Eichholz, Huyskens-Keil, Keller, Ulrich, Kroh e Rohn (2011) avaliaram cultivares de mirtilos expostos à radiação-UV, identificando diferentes classes de compostos voláteis. A primeira classe foi a dos aldeídos-C6, composta por hexanal, (Z) - 3- hexenal e (E) -2-hexenal. Foram identificados monoterpenos, como o D-limoneno e eucaliptol. Linalol, alfa-terpineol e geraniol foram os álcoois terpenos identificados. Além disso, foram detectados os compostos pertencentes à classe dos álcoois, como o 1-hexanol, (Z) -3-hexenol e, (E) -2-hexenol e a cetona metil-isohexenil-cetona. O composto predominante foi o (E) -2-hexenal, um aldeído que tem um impacto significante no sabor dos mirtilos.

3.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são compostos derivados do metabolismo especializado de plantas, sendo importantes determinantes na qualidade sensorial e nutricional dos alimentos de origem vegetal. São o grupo de fitoquímicos mais presente, possuindo considerável importância fisiológica e morfológica nas plantas. Na planta desempenham funções, tais como fitoalexinas, atrativos para polinizadores, contribuintes para a pigmentação de plantas, antioxidantes e agentes protetores contra a luz UV, entre outros. Estas propriedades fazem com que estes compostos tenham um papel importante no crescimento e reprodução das plantas, proporcionando uma proteção eficiente contra patógenos e predadores, além de contribuir para as características sensoriais de frutas e vegetais (Balasundram, Sundram e Samman, 2006; Naczk e Shahidi, 2006; Ignat, Volf e Popa, 2011).

As pequenas frutas são muitas vezes a fonte mais rica em compostos fenólicos (Tabela 4) entre frutas e vegetais, e atraem muita atenção devido ao seu papel positivo na saúde humana e na prevenção de doenças. Uma grande variedade de fenólicos pode ser detectada em espécies de pequenas frutas, que são particularmente abundantes em flavonóis. Anteriormente, as propriedades de promoção da saúde de fenólicos estavam restritas apenas às atividades antioxidantes. Atualmente, mais evidências estão apontando para o papel dos polifenóis como moléculas sinalizadoras, envolvidas na modulação das vias de sinal e, portanto, afetando a função celular e a expressão gênica, além do efeito direto no sistema digestivo, atuando como importantes aliados no tratamento e combate às doenças crônicas (Aaby, Mazur, Nes e Skrede, 2012; Del Rio, Rodriguez-Mateos, Spencer, Tognolini, Borges e Crozier, 2013; Veberic et al., 2014).

Tabela 4. Compostos fenólicos individuais identificados nas pequenas frutas morango, amora-preta e mirtilo.

Compostos Fenólicos	Referências		
	Morango	Amora-preta	Mirtilo
Delfinidina-3 – glicosídeo	Cerezo et al. (2010)	ND	You et al. (2011); Gavrilova et al. (2011)
Cianidina-3-galactosídeo	Cerezo et al. (2010)	ND	You et al. (2011); Gavrilova et al. (2011)
Cianidina-3-glicosídeo	Gin et al. (2011); (Holzwarth et al. (2012)	Acosta-Montoya et al. (2010); Bowen-Forbes et al. (2010)	You et al. (2011)
Peonidina-3 – glicosídeo	Ornelas-Paz et al. (2013)	ND	You et al. (2011)
Malvidina-3-galactosídeo	ND	Huang et al. (2012)	You et al. (2011); Gavrilova et al. (2011)
Malvidina-3-glicosídeo	Huang et al. (2012); Canuto et al. (2016)	Huang et al. (2012)	You et al. (2011); Gavrilova et al. (2011)
Quercetina-3-glicosídeo	Wang & Millner (2009)	Diaconeasa et al. (2014)	You et al. (2011); Gavrilova et al. (2011)
Ácido Gálico	Huang et al. (2012); Ornelas-Paz et al. (2013)	Martini et al. (2009)	ND
Ácido Caféico	Kelebek et al. (2011); Huang et al. (2012)	Huang et al. (2012); Martini et al. (2009)	You et al. (2011); Huang et al. (2012)
Ácido p-Cúmarico	Holzwarth et al. (2012); Huang et al. (2012)	Huang et al. (2012)	You et al. (2011)
Rutina	ND	Huang et al. (2012); Martini et al. (2009)	Gavrilova et al. (2011); Huang et al. (2012)

(+)-catequina	Holzwarth et al. (2012); Huang et al. (2012)	Huang et al. (2012)	Gavrilova et al. (2011); Huang et al. (2012)
Pelargonidina -3- glicosídeo	Gin et al. (2011); Holzwarth et al. (2012)	Bowen-Forbes et al. (2010)	ND
Pelargonidina 3- rutinosídeo	Holzwarth et al. (2012); Cerezo et al. (2010)	Bowen-Forbes et al. (2010)	ND

***** ND – não detectado.

4. Atividades biológicas

4.1 Atividade antioxidante

Os organismos vivos possuem um sistema de oxidação-redução que é necessário para manter um equilíbrio entre os radicais livres gerados e o sistema antioxidante. Como forma de proteção contra a produção excessiva de radicais livres, o organismo humano instala um processo de estresse oxidativo, que pode causar diversas doenças degenerativas e acelerar o processo de envelhecimento. A presença, principalmente de antocianinas em pequenas frutas é responsável por grande parte de sua capacidqde antioxidante (Mandave et al., 2017).

Souza, Pereira, Silva, Lima, Pio e Queiroz (2014) avaliaram a atividade antioxidante por meio de três métodos distintos, DPPH, ABTS e β-caroteno, de diferentes pequenas frutas provenientes do Brasil, incluindo o morango, a amora-preta e o mirtilo. Como parâmetro, foi considerada uma alta atividade antioxidante quando as frutas obtiveram valores superiores a 70 % de atividade antioxidante (captura do radical DPPH e ABTS e inibição da peroxidação lipídica pelo β-caroteno); intermediária, atividade antioxidante de 40 – 70 %; e baixa, os que tiveram atividade antioxidante menor do que 40 %.

De acordo com os resultados, a amora-preta obteve a atividade antioxidante alta, o morango uma atividade intermediária, e o mirtilo, uma baixa atividade.

Huang, Zhang, Liu e Li (2012) avaliaram a capacidade antioxidante pelo método ABTS de mirtilo, amora-preta e morango cultivados em Nanjing. O mirtilo, obteve atividade antioxidante de 14,98 mmol.Trolox / 100 g de peso seco, a mais alta atividade antioxidante dentre os frutos estudados, seguido da amora-preta (11.48 mmol Trolox/100 g) e do morango (4.4 mmol Trolox/100 g). Na análise pela captura do radical DPPH, os valores de IC_{50} (concentração de inibição de 50% do radical) para mirtilo, amora-preta e morango foram de 0.42, 0.44, e 0.81 mg / mL, respectivamente, demonstrando novamente que o mirtilo possui a mais alta atividade antioxidante. Estes resultados demonstram que o consumo destas pequenas frutas pode promover inúmeras atividades biológicas, além de possuir potencial para serem utilizados como ingredientes alimentares, devido as duas propriedades bioativas.

4.2 Atividade antidiabética

A *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) é considerada uma das doenças crônicas não transmissíveis mais prevalentes no mundo, que apresenta elevada morbimortalidade. Dentre os tratamentos da doença, a terapia nutricional é reconhecida como um importante agente. Várias diretrizes nutricionais baseadas em evidências foram publicadas indicando o impacto da qualidade e quantidade da dieta no tratamento e prevenção da DM2. Esta patologia é caracterizada por altos teores de glicose no sangue, que é responsável por falhas e disfunções de vários órgãos. Diversos estudos mostram uma correlação entre o maior consumo de frutas, especialmente pequenas frutas, na redução da incidência de diabetes. Uma das medidas de controle da diabetes tipo 2 é o manejo da hiperglicemia via inibição das glicosidases, enzimas que controlam a degradação e absorção de glicose, e seus precursores no intestino

delgado (Cheplick, Kwon, Bhowmik e Shetty, 2010; Afrin et al., 2016; Mandave et al., 2017).

Pinto, Kwon, Apostolidis, Lajolo, Genovese e Shetty (2008) avaliaram sete cultivares de morango cultivadas no Brasil, detectando que os mesmos eram ricos em ácido elágico, quercetina e ácido clorogênico. Os mesmos tiveram alta atividade inibitória da alfa-glicosidade e baixa inibição da alfa-amilase, fator que sugere que os morangos podem ser considerados como uma fonte na dieta com potencial anti-hiperglicêmico. Já Cheplick et al. (2010) avaliaram o efeito de extratos de diferentes cultivares de morango na atividade *in vitro* da alfa-amilase, alfa-glicosidase e enzima conversora da angiotensina-1 (ECA), observando que, de modo geral, a inibição da alfa-glicosidase foi uniforme nas diferentes cultivares, porém satisfatória, e inibição moderada da alfa-amilase e ECA, concluindo que cultivares de morango podem ocasionar a promoção da saúde, por meio de sua capacidade de inibir a alfa-glicosidase, inibir moderadamente a alfa-amilase, e inibir a ECA.

A amora-preta contém altos níveis de antocianinas e outros compostos fenólicos, principalmente flavonois e elagitaninos, que contribuem para sua alta capacidade antioxidante e outras atividades biológicas. Azofeifa et al. (2016) avaliaram o efeito do consumo de duas diferentes bebidas de amora-preta, nas concentrações de 25 % e 12,5 % administradas por via oral durante 40 dias a ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. A maior dose de amora-preta (25%) diminuiu significativamente a glicose (-48,6%), melhorou a capacidade antioxidante do plasma e reduziu os níveis de peroxidação lipídica. Estes resultados mostram os efeitos positivos do consumo de bebidas de amora-preta em condições de diabetes, sugerindo que a administração da fruta e seus derivados podem ser grandes aliados no combate à doença.

Wang, Camp e Ehlenfeldt (2012) avaliaram diferentes genótipos de mirtilo, tanto a polpa quanto a casca, em relação ao teor de fitoquímicos e atividades antioxidante

e frente à enzima alfa- glicosidase, observando que a casca possuía atividade inibitória da alfa-glicosidase mais elevada do que a polpa em todas as amostras testadas, demonstrando a importância do consumo da fruta inteira para a promoção da saúde. Wu, Zhou, Chen, Li, Wang e Zhang (2017) avaliaram diferentes cultivares de mirtilo e observaram diferentes teores de inibição da enzima alfa-glicosidase demostrando que o mirtilo é um excelente inibidor da enzima, podendo ser utilizado como antioxidante ou antidiabético, e também como um aditivo alimentar, promovendo, assim, a prevenção e o tratamento da DM2.

4.3 Atividade antilipidêmica

Os compostos fenólicos presentes em morango promovem uma diminuição da lipemia pós-prandial quando consumidos com uma refeição contendo gordura diminuindo os níveis de colesterol, triglicerídeos e LDL em 5%, 14% e 5% respectivamente (Burton-Freeman, Linares, Hyson e Kappagoda, 2014).

O ácido elágico, um composto presente em morango, reduz estresse oxidativo e formação de lesão aterosclerótica em coelhos hiperlipidêmicos (Yu, Chang, Wu e Chiang, 2005). Basu et al. (2010) avaliaram 27 indivíduos com síndrome metabólica, um conjunto de condições que aumentam o risco de doença cardíaca, acidente vascular cerebral e diabetes, com média de idade de 47 anos, administrando quatro xícaras de bebida adicionada de morango liofilizado, diariamente, durante 8 semanas, o equivalente à cerca de três xícaras de morangos frescos, utilizando um grupo controle que consumiu a mesma quantidade de água. Foi observado que a suplementação de morango diminuiu significativamente o colesterol total e a lipoproteína de baixa densidade (LDL).

Azofeifa et al. (2016) avaliaram a atividade de bebidas à base de amora-preta, nas concentrações de 12.5 % e 25 % em camundongos com diabetes induzida por

estreptozotocina. A concentração de 12.5 % já reduziu os triacilgliceróis (-4.6 %), e colesterol (-21%), porém, a concentração de 25 % obteve resultados ainda melhores, reduzindo os triacilgliceróis e o colesterol em 48.6 % e 43.5 %, respectivamente, mostrando que a fruta pode ser utilizada no controle da hiperlipidemia.

Çoban, Evran, Özkan, Cevik, Doğru-Abbasoğlu e Uysal (2013) avaliaram o efeito de mirtilos sobre os parâmetros de teor de lipídios e estresse oxidativo em cobaias hipercolesterolêmicas. Os animais foram alimentados por 75 dias com dieta rica em colesterol, suplementada com mirtilos frescos. O mirtilo reduziu o estresse oxidativo e o acúmulo de colesterol na aorta e no fígado das cobaias, demostrando efeito benéfico e potencial utilização como modulador desta enfermidade.

4.4 Atividade anticancerígena

Os efeitos anticarcinogênicos das frutas são mediados principalmente pela desintoxicação de carcinógenos, eliminação de espécies reativas de oxigênio, angiogênese e diminuição da redução do dano oxidativo do DNA pela apoptose, parada do ciclo celular, regulação negativa da proteína ativadora-1 e NF-κB e inibição da sinalização Wnt e TNF-α (Xue et al., 2001; Atalay et al., 2003; Seeram et al., 2006b; Duthie, 2007; Stoner, Wang e Casto, 2008; Zhang, Seeram, Lee, Feng e Heber, 2008). Foi demonstrado, em um estudo de coorte com 490.802 participantes que consumo do subgrupo botânico *Rosaceae*, incluindo morangos, apresenta um efeito protetor contra o carcinoma de células escamosas do esofágico humano e câncer de cabeça e pescoço quando comparado à grupos que não ingeriam a fruta, ou que consumiram outros grupos botânicos (Freedman et al., 2007; Freedman et al., 2008). Chen et al. (2012) demonstraram que o morango liofilizado possui um efeito preventivo na investigação clínica de fase II em indivíduos diagnosticados com lesão pré-maligna displásica esofágica, demonstrando que a ingestão de morangos, na quantidade de

60 g / dia, por um período de 6 meses, é capaz de inibir a progressão de lesões pré-cancerosas, dependente da dose, através da supressão da ativação de NF-κB e da regulação negativa da enzima COX-2 e iNOS.

Bowen-Forbes, Zhang e Nair (2010) avaliaram cultivares de amora-preta proveniente da Jamaica, demonstrando que as mesmas possuem potencial anticarcinogênico, já que as frutas inibiram a proliferação de células tumorais enzimáticas e humanas. O extrato demonstrou moderada atividade inibitória da enzima COX e inibiu o crescimento de células cancerígenas, inibindo cólon, mama, pulmão e células tumorais gástricas humanas.

Li, Wang, Li e Jin (2014) trataram células de câncer hepatocelular humano (HepG2), com antocianinas extraídas de mirtilo nas concentrações de 200, 400, 600, 800 e 1000 µg / mL, por um período de 48h, e avaliaram os efeitos sobre a proliferação celular e apoptose. O ensaio mostrou que o crescimento celular foi drasticamente inibido no grupo das antocianinas, e esta inibição foi dependente da dose. A maior inibição (80 ± 1,2%) foi observada na dose de 1000 µg / mL. A Caspase-3, uma protease da morte frequentemente ativada que catalisa a clivagem específica de muitas proteínas celulares foi elevada com o tratamento com antocianinas, demonstrando que a mesma possui potencial na promoção da apoptose de células HepG2. Em conjunto, os resultados sugerem que as antocianinas, presentes em mirtilos podem agir como um agente contra o câncer de fígado.

4.5 Atividade anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta normal, protetora e temporária do sistema imune a patógenos e lesões. No entanto, com estímulos recorrentes ou regulação ineficiente, a inflamação crônica se inicia e mantém um estado pró-inflamatório que é o principal fator que contribui para o desenvolvimento, progressão e complicação das doenças mais comumente conhecidas, como as doenças cardiovasculares, Alzheimer e *diabetes mellitus* tipo 2. Respostas inflamatórias podem ser desencadeadas por diferentes estímulos, como vírus, alterações nos níveis de espécies reativas de oxigênio, status redox celular, ácidos graxos, fatores de crescimento, e fatores causadores do câncer (Joseph, Edirisinghe e Burton-Freeman, 2014).

Parelman, Storms, Kirschke, Huang e Zunino (2012) avaliaram a capacidade anti-inflamatória e reguladora de glicose de morangos liofilizados em camundongos com obesidade induzida por dieta. Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo que o primeiro foi alimentado com uma dieta pobre em gordura (13% de gordura), o segundo com suplemento com 2% a 6% de morango liofilizado, o terceiro com uma dieta rica em gordura (44% de gordura), e o quarto com 2- 6% de morango em pó. Os resultados demonstraram que o consumo regular de morangos pode contribuir para a manutenção da glicemia na obesidade, e pode ser benéfico na regulação de muitos aspectos da inflamação sistêmica e da disfunção mediada por inflamação em camundongos não obesos. Já Alarcón, Fuentes, Olate, Navarrete, Carrasco e Palomo (2014) avaliaram sistematicamente a ação dos morangos na prevenção da ativação plaquetária e na formação de trombos em camundongos. Nos animais não tratados com a fruta, a artéria mesentérica foi totalmente bloqueada por um trombo volumoso estável aos 20 minutos, enquanto em animais tratados com extrato de morango o tempo necessário para formar a trombose arterial foi drasticamente prolongado. Assim, uma injeção intraperitoneal de 113 µg de extrato de morango (200 mg / kg) 30 minutos antes da lesão preveniu a formação de trombos por mais de 60 minutos após dano induzido, o que sugere que o morango pode exercer efeitos protetores significativos nos distúrbios relacionados ao tromboembolismo, inibindo a agregação plaquetária. Além disso, isso sugere que a atividade antitrombótica pode ter novos efeitos anti-inflamatórios.

Srivastava, Greenpan, Hartle, Hargrove, Amarowicz e Pegg (2010) avaliaram as atividades anti-inflamatórias tópicas de compostos fenólicos de baixo e alto peso molecular isoladas de três cultivares de amora-preta. Os extratos foram testados em edema induzido em orelha de camundongo. Tanto os fenóis de alto peso molecular quanto os de baixo peso molecular reduziram a lesão.

A atividade da mieloperoxidase de orelha de camundongo, um indicador de infiltração de leucócitos polimorfonucleares, foi significativamente reduzida após a aplicação de todas as preparações de amoreira-preta.

Esposito, Chen, Grace, Komarnytsky e Lila (2014) determinou a capacidade dos bioativos contidos em mirtilo na proteção de macrófagos RAW 264.7 da inflamação induzida por lipopolissacarídeos. Através do fracionamento, foram obtidas frações ricas em frações ricas em polifenois (PPR), ricas em antocianinas (ANC) e proantocianidinas (PAC), uma fração acetato de etila (EA) além de um extrato bruto obtido da fruta inteira. Também foram utilizados os padrões malvidina-3-glicosídeo, epicatequina e ácido clorogênico. Os resultados obtidos demonstram que as frações PPR, ANC e PAC suprimiram mais efetivamente os biomarcadores mRNA da inflamação aguda (Cox-2, iNOS e IL-1β). A malvidina-3-glicosídeo foi significativamente mais eficaz que a epicatequina ou o ácido clorogênico na redução da expressão de genes pró-inflamatórios in vitro.

4.6 Atividade anti-envelhecimento

O envelhecimento da pele pode ocorrer de acordo com diversos fatores, incluindo a radiação UV, que é absorvida pela pele e ocasiona um aumento nas espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs agem como moléculas de sinalização celular e podem causar peroxidação lipídica, dano mitocondrial e de DNA e modificação de proteínas e genes. Também são capazes de iniciar vias moleculares complexas, incluindo a ativação de enzimas como a metaloproteinase colagenase, a serina-protease elastase e a mucopolissacarase hialuronidase, que degradam os componentes da matriz extra-celular, resultando em alterações visíveis na pele, como rugas e variações de espessura, além de acelerar a pigmentação da pele por sua ação nos queratinócitos, tomelanócitos adjacentes, para induzir a melanogênese.

Uma alimentação rica em compostos antioxidantes pode ser uma alternativa para o retardo do envelhecimento, e isto inclui frutas e vegetais (Bravo, Alzete e Osorio, 2016).

Giampieri et al. (2014) avaliou as atividades antioxidante e antienvelhecimento de extrato de morango rico em polifenois, utilizando fibroblastos dérmicos humanos induzidos ao estresse por H_2O_2. O extrato de morango apresentou alta capacidade antioxidante e uma concentração relevante de vitaminas e compostos fenólicos. Os fibroblastos incubados com extrato de morango e estressados com H_2O_2 mostraram um aumento na viabilidade celular, uma menor quantidade intracelular de espécies reativas de oxigênio, e uma redução da peroxidação lipídica da membrana e danos no DNA. O mesmo também ocasionou a melhora da funcionalidade mitocondrial, aumentando a respiração basal das mitocôndrias e promovendo uma capacidade regenerativa das células após a exposição a estímulos pró-oxidantes, demonstrando, assim, que os morangos possuem propriedades antioxidantes e fornecem proteção da pele contra o estresse oxidativo e o envelhecimento.

Herrmann et al. (2007) avaliaram extratos de folhas de amora-preta na expressão na proteína e no nível de ARNm utilizando fibroblastos dérmicos humanos não irradiados e irradiados com radiação UVA. O extrato mostrou redução do nível de proteína MMP-1 de células irradiadas e não irradiadas com uma inibição quase completa em uma concentração de 0,1%. O extrato também inibiu a IL-1a, uma citocina conhecida por induzir a expressão de metaloproteinases, o que demonstra que o extrato de folhas de amora-preta é um ativo anti-envelhecimento multifuncional altamente eficiente.

Bae et al. (2009) investigaram a capacidade de extratos de mirtilo, ricos em antocianinas, de inibir o foto-envelhecimento em fibroblastos dérmicos humanos

irradiados com UV-B. O extrato suprimiu a degradação do colágeno pelo embotamento da produção de metaloproteinases da matriz colagenolítica (MMP) e inibiu o foto-envelhecimento em fibroblastos dérmicos humanos irradiados com UV-B, o que sugere que o mirtilo pode ser protetor contra o fotoenvelhecimento cutâneo induzido por UV.

4.7 Atividade antimicrobiana

Diversos estudos relatam que as pequenas frutas possuem atividade antimicrobiana. Martini et al. (2009) avaliando o efeito antimicrobiano de extratos de folhas de amora-preta frente as estirpes G21 e 10K de *Helicobacter pylori* observou que este apresenta efeito bacteriano nas concentrações 1200 g/mL e 1500 g/mL após 24 h de exposição e 134 g/mL e 270 g/mL após 48h de exposição.

Extratos de folhas de mirtilo em diferentes estádios de maturação e extraídos com solventes distintos apresentaram forte atividade antimicrobiana contra as bactérias *E.coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* e frente ao fungo *Monilina Vaccinii-corybosi*, entretanto o efeito inibitório não foi observado para S. Typhimurium (Deng et al., 2014).

Extratos de morango na concentração de 100% inibem *E. faecalis* e *Porphyromonas gingivalis* (Widyarman, Widjaja e Idrus, 2017). Enquanto extratos metanólicos e etanólicos apresentaram efeito antimicrobiano frente a cepas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (Liya e Siddique, 2018).

5. Conclusões

O consumo das pequenas frutas morango, amora-preta e mirtilo, tanto *in natura* como em produtos à base dos mesmos ocasiona inúmeros benefícios à saúde, o que se deve principalmente à sua composição, rica principalmente em compostos

fenólicos. Estudos *in vitro* e *in vivo* e epidemiológicos demostram que as mesmas são capazes de auxiliar no tratamento de diversas doenças crônicas não transmissíveis devido às suas atividades antioxidantes, antilipidemica, antidiabéticas, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas e anti-envelhecimento, sendo uma alternativa viável para a promoção de saúde.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ pelo apoio financeiro e concessão de bolsas de estudos.

Referências Bibliográficas

Aaby, K., Mazur, S., Nes, A., & Skrede, G. (2012). Phenolic compounds in strawberry (Fragaria x ananassa Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry,* 132(1), 86–97. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.037.

Acosta-Montoya, Ó., Vaillant, F., Cozzano, S., Mertz, C., Pérez, A. M., & Castro, M. V. (2010). Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (Rubus adenotrichus Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry,* 119(4), 1497–1501. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.032.

Afrin, S., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Reboredo-Rodriguez, P., Mezzetti, B., Varela-López, A., Giampieri, F., Battino, M. (2016). Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(22), 4435–4449. http://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00857.

Alarcón, M., Fuentes, E., Olate, N., Navarrete, S., Carrasco, G., & Palomo, I. (2014). Strawberry extract presents antiplatelet activity by inhibition of inflammatory mediator of atherosclerosis (sP-selectin, sCD40L, RANTES, and IL-1β) and thrombus formation. *Platelets,* 26(3), 224–229. http://doi.org/10.3109/09537104.2014.898747.

Atalay, M., Gordillo, G., Roy, S., Rovin, B., Bagchi, D., Bagchi, M., & Sen, C. K. (2003). Anti-angiogenic property of edible berry in a model of hemangioma. *FEBS Letters*, *544*(1-3), 252-257. http://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00509-x.

Ayala-Zavala, J. F., Wang, S. Y., Wang, C. Y., & Aguilar, G. A. G. (2004). Effect of storage temperature on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *LWT- Food Science and Tecnology*, 37(7), 687-695. http://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.002.

Azefeifa, G., Quesada, S., Navarro, L., Hidalgo, O., Portet, K., Pérez, A. M., Vaillant, F., Poucheret, P., & Michel, A. (2016). Hypoglycaemic, hypolipidaemic and antioxidant effects of blackberry beverage consumption in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 26, 330-337. http://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.007.

Bae, J. Y., Lim, S. S., Kim, S. J., Choi, J. S., Park, J., Ju, S. M., Han, S. J., Kang, I. J., Kang, Y. H. (2009). Bog blueberry anthocyanins alleviate photoaging in ultraviolet-B irradiation-induced human dermal fibroblasts. *Molecular Nutrition & Food Research,* 53(6), 726–738. http://doi.org/10.1002/mnfr.200800245.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042.

Basu, A., Fu, D. X., Wilkinson, M., Simmons, B., Wu, M., Betts, N. M., Du, M., & Lyons, T. J. (2010). Strawberries decrease atherosclerotic markers in subjects with metabolic syndrome. *Nutrition research*, 30(7), 462-469. http://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.06.016.

Bowen-Forbes, C. S., Zhang, Y., & Nair, M. G. (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis,* 23(6), 554–560. http://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.08.012.

Bravo, K., Alzate, F., & Osorio, E. (2016). Fruits of selected wild and cultivated Andean plants as sources of potential compounds with antioxidant and anti-aging activity. *Industrial Crops and Products,* 85, 341–352. http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.074.

Burton-Freeman, B., Linares, A., Hyson, D., & Kappagoda, T. (2014). Strawberry Modulates LDL Oxidation and Postprandial Lipemia in Response to High-Fat Meal in Overweight Hyperlipidemic Men and Women. *Journal of the American College of Nutrition*, 29(1), 46-54. http://doi.org/10.1080/07315724.2010.10719816.

Bushway, R. J., Gann, D. F. M., Cook, W. P., & Bushway, A. A. (1983). Mineral and Vitamin Content of Lowbush Blueberries (Vaccinium angustifolium Ait.). *Journal of Food Science*, 48(6), 1878–1878. http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb05109.x.

Canuto, G. A., Oliveira, D. R., da Conceição, L. S., Farah, J. P., & Tavares, M. F.(2016). Development and validation of a liquid chromatography method for anthocyanins in strawberry (*Fragaria* spp.) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power. *Food Chemistry*, *192*, 566-574. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.095.

Cerezo, A. B., Cuevas, E., Winterhalter, P., Garcia-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2010). Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chemistry*, 123(3), 574–582. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.073

Chen, T., Yan, F., Qian, J., Guo, M., Zhang, H., Tang, X., Chen, F., Stoner, G. D., & Wang, X. (2012). Randomized phase II trial of lyophilized strawberries in patients with dysplastic precancerous lesions of the esophagus. *Cancer Prevention Research*, *5*(1), 41-50. http://doi.org/10.1158/1940-6207.capr-11-0469.

Cheplick, S., Kwon, Y. I., Bhowmik, P., & Shetty, K. (2010). Phenolic-linked variation in strawberry cultivars for potential dietary management of hyperglycemia and related complications of hypertension. *Bioresource Technology*, 101(1), 404–413. http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.068.

Çoban, J., Evran, B., Özkan, F., Çevik, A., Doğru-Abbasoğlu, S., & Uysal, M. (2013). Effect of blueberry feeding on lipids and oxidative stress in the serum, liver and aorta of guinea pigs fed on a high-cholesterol diet. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(2), 389-391. http://doi.org/10.1271/bbb.120722.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 18(14), 1818-1892. http://doi.org/10.1089/ars.2012.4581.

Deng, Y., Yang, G., Yue, J., Qian, B., Liu, Z., Wang, D., Zhong, Y., & Zhao, Y. (2014). Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. *Food Control*, 38, 184-191. http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.023.

Diaconeasa, Z., Florica, R., Rugină, D., Lucian, C., & Socaciu, C. (2014). HPLC/PDA–ESI/MS identification of phenolic acids, flavonol glycosides and antioxidant potential in blueberry, blackberry, raspberries and cranberries. *Journal of Food and Nutrition Research*, *2*(11), 781-785. http://doi.org/10.12691/jfnr-2-11-4.

Du, X., Finn, C. E., & Qian, M. C. (2010). Volatile composition and odour-activity value of thornless “Black Diamond” and “Marion” blackberries. *Food Chemistry*, 119(3), 1127-1134. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.024.

Duthie, S. J. (2007). Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Molecular nutrition & food research*, *51*(6), 665-674. http://doi.org/10.1002/mnfr.200600257.

Eichholz, I., Huyskens-Keil, S., Keller, A., Ulrich, D., Kroh, L. W., & Rohn, S. (2011). UV-B-induced changes of volatile metabolites and phenolic compounds in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry,* 126(1), 60–64. http://doi.org/ 10.1016/j.foodchem.2010.10.071.

Esposito, D., Chen, A., Grace, M. H., Komarnytsky, S., & Lila, M. A. (2014). Inhibitory Effects of Wild Blueberry Anthocyanins and Other Flavonoids on Biomarkers of Acute and Chronic Inflammation in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 62(29), 7022–7028. http://doi.org/10.1021/jf4051599.

Forney, C. F., Kalt, W., & Jordan, M. A. (2000). The composition of strawberry aroma is influenced by cultivar, maturity, and storage. *HortScience*, 35(6), 1022-1026.

Freedman, N. D., Park, Y., Subar, A. F., Hollenbeck, A. R., Leitzmann, M. F., Schatzkin, A., & Abnet, C. C. (2007). Fruit and vegetable intake and esophageal cancer in a large prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, 121(12), 2753-2760. http://doi.org/10.1002/ijc.22993.

Freedman, N. D., Park, Y., Subar, A. F., Hollenbeck, A. R., Leitzmann, M. F., Schatzkin, A., & Abnet, C. C. (2008). Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, 122(10), 2330-2336. http://doi.org/10.1002/ijc.23319.

Gavrilova, V., Kajdzanoska, M., Gjamovski, V., & Stefova, M. (2011). Separation, Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Blueberries and Red and Black Currants by HPLC− DAD− ESI-MS n. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 4009-4018. http://doi.org/10.1021/jf104565y.

Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J., Mazzoni, L., Forbes-Hernandez, T., Gasparrini, M., Gonzàlez-Paramàs, A., Santos-Buelga, C., Quiles, J. L., Bompadre, S., Mezzetti, B., & Battino, M. (2014). Polyphenol-Rich Strawberry Extract Protects Human Dermal Fibroblasts against Hydrogen Peroxide Oxidative Damage and Improves Mitochondrial Functionality. *Molecules*, 19(6), 7798–7816. http://doi.org/10.3390/molecules19067798.

Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28(1), 9-19. http://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009.

Herrmann, M., Grether-Beck, S., Meyer, I., Franke, H., Joppe, H., Krutmann, J., & Vielhaber, G. (2007). Blackberry leaf extract: a multifunctional anti-aging active. *International Journal of Cosmetic Science,* 29(5), 411–411. http://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2007.00389_5.x.

Holzwarth, M., Korhummel, S., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2012). Evaluation of the effects of different freezing and thawing methods on color, polyphenol and ascorbic acid retention in strawberries (Fragaria×ananassa Duch.). *Food Research International,* 48(1), 241–248. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.004.

Huang, W. Y., Zhang, H. C., Liu, W. X., & Li, C. Y. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University Science B*, 13(2), 94-102. http://doi.org/10.1631/jzus.b1100137.

Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables*. Food Chemistry,* 126(4), 1821–1835*.* http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026.

Joseph, S. V., Edirisinghe, I., & Burton-Freeman, B. M. (2014). Berries: anti-inflammatory effects in humans. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(18), 3886-3903. http://doi.org/10.1021/jf4044056.

Juranić, Z., & Žižak, Ž. (2005). Biological activities of berries: from antioxidant capacity to anti-cancer effects. *BioFactors*, 23(4), 207-211. http://doi.org/10.1002/biof.5520230405.

Kapur, B., Sarıdaş, M. A., Çeliktopuz, E., Kafkas, E., & Paydaş Kargı, S. (2018). Health and taste related compounds in strawberries under various irrigation regimes and bio-stimulant application. *Food Chemistry*, 263, 67–

73.doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.108.

Kaume, L., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2011). The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5716–
5727. http://doi.org/10.1021/jf203318p.

Krolow, A. C. R., Schwengber, J. E., & Ferri, N. L. (2007). Avaliações físicas e químicas de morango cv. Aromas produzidos em sistema orgânico e convencional. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 2(2), 1732-1735.

Li, Y. W., Wang, D., Li, X. G., & Jin, Y. (2014). Anthocyanins Extracted from Chinese Blueberry and its Anticancer Effects on HepG2 Cells. *Advanced Materials Research,* 887-888, 592–595. http://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.887-888.592.

Liya, S.J., & Siddique, R. (2018). Determination of Antimicrobial Activity of Some Commercial Fruit (Apple, Papaya, Lemon and Strawberry) against Bacteria Causing Urinary Tract Infection. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 8, 95-99. http://doi.org/10.1556/1886.2018.00014.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). *Polyphenols: food sources and bioavailability*. The American Journal of Clinical Nutrition, 79(5), 727–747. http://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727.

Mandave, P., Khadke, S., Karandikar, M., Pandit, V., Ranjekar, P., Kuvalekar, A., & Mantri, N. (2017). Antidiabetic, Lipid Normalizing, and Nephroprotective Actions of the Strawberry: A Potent Supplementary Fruit. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 124. http://doi.org/10.3390/ijms18010124.

Martini, S., D'Addario, C., Colacevich, A., Focardi, S., Borghini, F., Santucci, A., Figura, N., & Rossi, C. (2009). Antimicrobial activity against Helicobacter pylori strains and antioxidant properties of blackberry leaves (Rubus ulmifolius) and isolated compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents,* 34(1), 50–59. http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.01.010.

Mazza, G. (2005). Compositional and Functional Properties of Saskatoon Berry and Blueberry. *International Journal of Fruit Science*, 5(3), 101– 120. http://doi.org/10.1300/j492v05n03_10.

Meyskens, F. L. (2005). *Diet and Cancer:* The Disconnect Between Epidemiology and Randomized Clinical Trials. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14(6), 1366–1369. http://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-04-0666.

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(3), 519–525. http://doi.org/10.1021/jf011062r.

Naczk, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523–1542. http://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002.

Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134–144. http://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007.

Ornelas-Paz, J. J., Yahia, E. M., Ramírez-Bustamante, N., Pérez-Martínez, J. D., Escalante-Minakata, M. del P., Ibarra-Junquera, V., Acosta-Muñiz, C., Guerrero-Prieto, V., & Ochoa-Reyes, E. (2013). Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (Fragaria x ananassa Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry,* 138(1), 372–381. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.006.

Pantelidis, G., Vasilakakis, M., Manganaris G., & Diamantidis, G. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102(3), 777-783. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.021.

Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Pérez, M., & Hernández-Pérez, T. (2010). Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life—a review. *Plant foods for human nutrition*, 65(3), 299-308. http://doi.org/10.1007/s11130-010-0177-1.

Parelman, M. A., Storms, D. H., Kirschke, C. P., Huang, L., & Zunino, S. J. (2012). Dietary strawberry powder reduces blood glucose concentrations in obese and lean C57BL/6 mice, and selectively lowers plasma C-reactive protein in lean mice. *British Journal of Nutrition*, *108*(10), 1789-1799. http://doi.org/10.1017/s0007114512000037.

Pinto, S. M., Kwon, Y. I., Apostolidis, E., Lajolo, F. M., Genovese, M. I., & Shetty, K. (2008). Functionality of bioactive compounds in Brazilian strawberry (Fragaria× ananassa Duch.) cultivars: evaluation of hyperglycemia and hypertension potential using in vitro models. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(12), 4386-4392. http://doi.org/ 10.1021/jf0732758.

Santos, E. P., Vinholes, J., Franzon, R. C., Dalmazo, G., Vizzotto, M., & Nora, L. (2018). Psidium cattleianum fruits: A review on its composition and bioactivity. *Food Chemistry,* 258, 95–103.doi:10.1016/j.foodchem.2018.03.024.

Seeram, N. P. (2006a). Berries. In *Nutritional Oncology (Second Edition)* (pp. 615-628). http://doi.org/10.1016/B978-012088393-6/50093-2.

Seeram, N. P. (2008). Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 627–629. http://doi.org/10.1021/jf071988k.

Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006b). 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(25), 9329-9339. http://doi.org/10.1021/jf061750g.

Souza, V. R., Pereira, P. A. P., Silva, T. L. T., Lima, L. C. O., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry, 156, 362-368.* http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.125.

Srivastava, A., Greenspan, P., Hartle, D. K., Hargrove, J. L., Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2010). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Polyphenolics from Southeastern U.S. Range Blackberry Cultivars*. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6102–6109. http://doi.org/10.1021/jf1004836.

Stoner, G. D., Wang, L. S., & Casto, B. C. (2008). Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries. *Carcinogenesis*, 29(9), 1665- 1674. . http://doi.org/10.1093/carcin/bgn142.

Veberic, R., Stampar, F., Schmitzer, V., Cunja, V., Zupan, A., Koron, D., & Mikulic-Petkovsek, M. (2014). Changes in the contents of anthocyanins and other compounds in blackberry fruits due to freezing and long-term frozen storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, *62*(29), 6926-6935. http://doi.org/10.1021/jf405143w.

Wang, S. Y., & Millner, P. (2009). Effect of Different Cultural Systems on Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Fruit Quality of Strawberries (Fragaria×aranassa Duch.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 57(20), 9651–9657. http://doi.org/10.1021/jf9020575.

Wang, S. Y., Camp, M. J., & Ehlenfeldt, M. K. (2012). Antioxidant capacity and α-glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132(4), 1759-1768. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.134.

Widyarman, A. S., Widjaja, S. B., & Idrus, E. (2017). Strawberry Extract's Effects on Enterococcus faecalis and Porphyromonas gingivalis Biofilms in vitro. *Scientific Dental Journal*, 1, 1-5. http://dx.doi.org/10.26912/sdj.v1i1.1911.

Wu, Y., Zhou, Q., Chen, X. Y., Li, X., Wang, Y., & Zhang, J. L. (2017). Comparison and screening of bioactive phenolic compounds in different blueberry cultivars: evaluation of anti-oxidation and α-glucosidase inhibition effect. *Food Research International*, 100, 312-324. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.004.

Xue, H., Aziz, R. M., Sun, N., Cassady, J. M., Kamendulis, L. M., Xu, Y., Stoner, G.D., & Klaunig, J. E. (2001). Inhibition of cellular transformation by berry extracts. *Carcinogenesis*, 22(2), 351-356. http://doi.org/10.1093/carcin/22.5.831.

You, Q., Wang, B., Chen, F., Huang, Z., Wang, X., & Luo, P. G. (2011). Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food Chemistry,* 125(1), 201-208.

http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.063.

Yu, Y. M., Chang, W. C., Wu, C. H., & Chiang, S. Y. (2005). Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(11), 675-681. http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.03.013.

Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J. A., & Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), 675-683. http://doi.org/10.1002/mnfr.200700002.

Zhang, H., Wang, Z.-Y., Yang, X., Zhao, H.-T., Zhang, Y.-C., Dong, A.-J., Jing, J., & Wang, J. (2014). Determination of free amino acids and 18 elements in freeze-dried strawberry and blueberry fruit using an Amino Acid Analyzer and ICP-MS with micro-wave digestion. *Food Chemistry*, 147, 189-194. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.118.

Zhang, Y., Seeram, N. P., Lee, R., Feng, L., & Heber, D. (2008). Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(3), 670-675. http://doi.org/10.1021/jf071989c.

Zhao, Y. (2008). *Berry fruit: value-added products for health promotion*. (1st ed). Boca Raton: CRC Press.

CAPÍTULO 3

ARTIGO 2: Morango (*Fragaria x ananassa*), amora-preta (*Rubus* spp.) e mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade): composição química, atividade antioxidante e ação sobre as enzimas digestivas alfa-glicosidase e alfa-amilase em dois ciclos produtivos das frutíferas

Submissão a ser realizada à revista científica **Food Chemistry**

(Periódico A1 para a área de Ciência e Tecnologia de Alimentos –

Fator de Impacto 4.946)

Taiane Mota Camargo

Pelotas, 2019

Morango (*Fragaria x ananassa*), amora-preta (*Rubus* spp.) e mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade): composição química, atividade antioxidante e ação sobre as enzimas digestivas alfa-glicosidase e alfa-amilase em dois ciclos produtivos das frutíferas

Taiane Mota Camargo[1,2]*, Elisa dos Santos Pereira[1,2], Fabiana Ross Nora[2], Gabriel Dalmazo[2], Cesar Valmor Rombaldi[2], Leonardo Nora[2], Márcia Vizzotto[1]

[1] *Embrapa Clima Temperado, BR 392, KM 78, C. P. 403, CEP 96010-971, Pelotas-RS, Brasil.*

[2] *Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Avenida Eliseu Maciel, S/N, CEP 96160-000, Capão do Leão, RS, Brasil.*

* Corresponding author. Tel.: +55 53 3275-8100

* E-mail adress: taianemcamargo@gmail.com

Resumo

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a *Diabetes mellitus* é uma doença crônica não-transmissível, que no ano de 2014 já atingia 422 milhões de pessoas em todo o mundo, com tendência de crescimento. Dentre as estratégias de tratamento da doença está a utilização de inibidores de enzimas digestivas (alfa-glicosidase e alfa- amilase), responsáveis pelo metabolismo de carboidratos. Neste estudo, em dois ciclos produtivos (2016 e 2017), foram caracterizados dois genótipos de morango (Camarosa e acesso 2011-6011), dois genótipos de amora-preta (Tupy e Xingú) e um genótipo de mirtilo (O'Neal). As variáveis analisadas foram: acidez, pH, sólidos solúveis, umidade, cinzas, lipídios, fibras, compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides, atividade antioxidante (DPPH, hidroxila e óxido nítrico), inibição de alfa-glicosidase e inibição de alfa-amilase. Dentre os resultados destacam-se: (1) a concentração de compostos fenólicos totais foi maior nas frutas do ciclo produtivo de 2016, à exceção da amora-preta do genótipo Xingú. (2) No ciclo produtivo de 2016 a concentração de antocianinas foi maior na amora-preta (Tupy e Xingú) e no mirtilo (O'Neal), entretanto, no ciclo produtivo de 2017, os dois genótipos de morango apresentaram maiores concentrações de antocianina. (3) Em todos os genótipos, à exceção do genótipo Tupy de amora-preta, a concentração de flavonoides foi mais elevada no ciclo produtivo de 2017. (4) Todos os genótipos atingiram IC_{25} para a enzima alfa-amilase e IC_{50} para a enzima alfa-glicosidase, com destaque para a amora preta do genótipo Tupy, do ciclo produtivo 2017, que resultou em inibição 7 vezes maior do que o controle positivo (acarbose) para a enzima alfa-amilase, e no menor IC_{50} para a alfa-glicosidase dentre os genótipos testados, sendo que o controle positivo quercetina (0,5 mg/mL a 500,0 mg/mL) não inibiu a alfa-glicosidase. À exceção do genótipo 2011-6011 de morango, todos os demais foram capazes de capturar 50 % dos radicais livres testados, ao contrário da acarbose, que não capturou nenhum dos radicais, e a quercetina que capturou apenas o DPPH. Em conclusão, os resultados demonstram que os genótipos testados de morango, amora-preta e mirtilo possuem potencial de uso no tratamento e prevenção da diabete, além de possuírem atividade antioxidante.

Palavras-chave: frutas vermelhas, *Diabetes mellitus*, compostos fenólicos.

1. Introdução

Atualmente, sabe-se que um denominador comum na patogênese da maioria das doenças crônicas é o envolvimento do estresse oxidativo. Paralelamente, um crescente número de estudos epidemiológicos sugere uma associação consistente entre o consumo de dietas à base de plantas e uma menor incidência de várias patologias crônicas. Há evidências convincentes de que a combinação de micronutrientes antioxidantes e compostos bioativos não essenciais, como os compostos de polifenois, contidos em frutas e vegetais desempenham um papel sinérgico e cumulativo na promoção da saúde (Tulipani et al., 2011)

Neste sentido, as pequenas frutas são, muitas vezes, a fonte mais rica em compostos fenólicos entre frutas e vegetais, e atraem muita atenção devido ao seu papel positivo na saúde humana e na prevenção de doenças. Uma grande variedade de fenólicos pode ser detectada em espécies de pequenas frutas (Veberic et al., 2014). Pertencentes ao grupo destas pequenas frutas estão o morango (*Fragaria x ananassa*), a amora-preta (*Rubus* spp.) e o mirtilo *(Vaccinium ashei* Reade).

O morango, pertencente à família *Rosaceae*, é uma das frutas mais valorizadas, não só por causa de seu alto conteúdo em vitaminas e minerais, mas também por suas características sensoriais, como sabor e aroma. São ricos em vitamina C, fibras, minerais, e ácidos orgânicos. Além disso, são excelentes fontes de compostos fenólicos. As amoras-pretas, pertencentes à mesma família do morango, podem ser encontradas cultivadas ou não (frutas nativas). O sabor da amora-preta é principalmente definido pelo equilíbrio entre os açúcares e os ácidos orgânicos. A cor intensa e quase negra das amoras pode ser correlacionada com a composição e níveis elevados de várias antocianinas presentes nas células das frutas. Os mirtilos são plantas florestais pertencentes à família *Ericaceae*. São frutas nutritivas, fontes de carboidratos, vitaminas, minerais e fibras. Possuem alta concentração de compostos fenólicos, incluindo flavonoides, ácidos hidroxicinâmicos e ácidos hidroxibenzóicos (Peinado et al., 2012; Veberic et al., 2014; Shi et al., 2017).

Os compostos fenólicos contidos nas pequenas frutas possuem capacidade antioxidante, que ocasiona uma série de funcionalidades, dentre elas a atuação como sequestrantes de radicais livres, decompositores de peróxido, inibidores de enzimas, além de retardar ou prevenir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, inibindo a iniciação ou a propagação de reações em cadeia oxidantes. Evidências crescentes

sugerem que seu consumo ajuda a prevenir o câncer, doenças crônicas, e também pode desempenhar um papel preventivo em defeitos congênitos, formação de catarata, hipertensão, asma, diverticulose, obesidade e da diabetes (Wang et al., 2012a).

Diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Nas últimas décadas, o DM tem se tornado um sério e crescente problema de saúde pública, devido ao aumento de sua prevalência. Um dos mecanismos de atuação para o controle da DM, é a inibição de enzimas digestivas, como a alfa-glicosidase e a alfa-amilase. Estas enzimas atuam no sistema digestório, hidrolisando o amido e liberando glicose e oligossacarídeos, retardando, assim, a digestão de carboidratos e reduzindo a quantidade de glicose absorvida, e, consequentemente, o aumento brusco da glicemia e insulinemia pós-prandial (aumento do nível de glicose no sangue após as refeições). Os inibidores desta enzima são exemplos de antidiabéticos orais. A acarbose é um exemplo de inibidor da alfa-glucosidase, pois atua na inibição das enzimas digestivas, retardando a absorção de glicose, e diminuindo, assim, as chances de pacientes com problemas de intolerância à glicose tornarem-se diabéticos. Em contraponto, o uso deste medicamento causa efeitos adversos como flatulência, dor abdominal e diarreia durante sua administração. Assim, o estudo de compostos presentes naturalmente em frutas, nos últimos anos, está sendo bastante estudados, visando um efeito antidiabético sem reações adversas aos usuários deste tipo de medicamento (Cheng et al., 2004; Yamagishi et al., 2009; Weinert et al., 2015).).

Assim, o objetivo deste estudo foi determinar a composição química e nutricional das pequenas frutas amora-preta (cultivares Tupy e Xingú), mirtilo (cultivar O'Neal) e morango (cultivar Camarosa e acesso 2011-6011), além de verificar a capacidade de inibição destas frente às enzimas digestivas alfa-glicosidade e alfa-amilase e suas atividades antioxidantes frente à diferentes radicais.

2. Material e Métodos

2.1 Padrões e reagentes

Os reagentes foram adquiridos de diferentes fornecedores. Radical 2,2- ifenil-1-picrilidrazilo (DPPH) D9132, tampão fosfato (pH 7,0), α-glicosidase (tipo I da levedura

de padeiro) G5003, 4-nitrofenil-α-D-glucopiranosídeo (PNP-G) N1377, α-amilase (do pâncreas porcino) A6255, cianidina-3-O-glicosídeo, reagente de Folin-Ciocalteu V0S0427, ácido gálico, quercetina, catequina, carbonato de sódio, amido, sal dissódico de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-Na), sulfato de ferro hepta-hidratado, ácido salicílico, sulfanilamida, dicloridrato de n- (1-naftilo), etilenodiamina, nitroprussiato de sódio (SNP) foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Etanol, acetona, metanol, acetonitrila, acetato de etila e ácido clorídrico foram adquiridos da empresa VETEC (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Iodo, iodeto de potássio, peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio, cloreto de alumínio, nitrito de sódio e ácido fosfórico foram adquiridos da empresa Synth (Diadema, SP, Brasil).

2.2 Aquisição da amostra

Foram utilizadas frutas de amora-preta, das cultivares Tupy e Xingú, de morango, da cultivar Camarosa e acesso 2011-6011, provenientes do campo experimental da Embrapa Clima Temperado, RS, Brasil, e mirtilo, da cultivar O'Neal, proveniente de uma propriedade particular, no Passo da Micaela, Pelotas, RS, Brasil. Foram coletadas frutas de dois ciclos produtivos (2016 e 2017), completamente maduras, de forma a se obter uma amostra representativa. As frutas foram selecionadas considerando-se a ausência de lesões e infecções visíveis, além de uniformidade de cor e tamanho. Após, as frutas foram congeladas à uma temperatura de – 20 °C e posteriormente liofilizadas em liofilizador (Liobrás - L101), sendo, em seguida, trituradas em moinho de bolas (Marconi - MA 350) e armazenadas em ultra- freezer (-80ºC) até o momento de análise.

2.3 Preparação dos extratos

As amostras de frutas liofilizadas foram pesadas em tubos falcon e extraídas utilizando etanol 98 % (concentração de 500 mg / mL de fruta fresca). Após, foram homogeneizadas utilizando homogeneizador Ultra-Turrax (Ika, Artur Nogueira, São Paulo, Brasil). Posteriormente, realizou-se a filtração utilizando filtros de papel (Whatman no 4), e armazenadas a -20 °C, protegidas da incidência de luz até a análise. As extrações foram realizadas em triplicata.

2.4 Caracterização físico-química

2.4.1 Determinação de pH

A análise foi realizada conforme a metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz (2008), com adaptações. Para tal, foram pesadas 10 g de amostra, *in natura*, e dissolvidas em 100 mL de água deionizada, agitando em agitador magnético. Após, procedeu-se a leitura direta em pHmetro. A análise foi realizada em triplicata.

2.4.2 Acidez total ou acidez titulável

A análise foi realizada conforme metodologia descrita pelo instituto Adolf Lutz (2008) com adaptações. Com o auxílio de uma centrífuga doméstica, foi preparado um suco a partir da fruta, *in natura*. Foram transferidos 10 mL da amostra para um béquer e a mesma será titulada com a solução de NaOH 0,1N em agitador magnético, até pH 8,1 (titulação potenciométrica). A análise foi realizada em triplicata. Os resultados foram expressos em g% de ácido cítrico.

2.4.3 Determinação de matéria seca

A análise foi realizada conforme metodologia descrita pelo instituto Adolf Lutz (2008) com adaptações. As amostras, *in natura*, foram cortadas, com o auxílio de uma faca, e pesadas em placa de Petri. As cápsulas foram taradas e anotou-se o peso. Nas cápsulas foram pesados 5 g de amostra, e após levou-se levadas à estufa, sem a tampa. As mesmas serão retiradas da estufa após 6 horas, e após esfriar, foram pesadas. Os resultados serão expressos em umidade por cento.

2.4.4 Determinação de Cinzas

A análise foi realizada conforme metodologia descrita pelo instituto Adolf Lutz (2008) com adaptações. Os cadinhos foram pesados, e seus pesos anotados. Após, pesou-se 1g de amostra nos cadinhos e os mesmos foram levados ao forno do tipo mufla a 300°C por 30 minutos. Em seguida, a temperatura foi aumentada lentamente até 600°C, e a amostra foi mantida nesta temperatura por 4h. Retirou-se os mesmos do forno mufla, deixou-se esfriar, e as cápsulas foram novamente pesadas. A análise foi realizada em triplicata. Os resultados foram expressos em cinzas por cento.

2.4.5 Determinação de Lipídeos

A análise foi realizada no extrator de gordura ANKOM^{XT15}, conforme descrito no manual do equipamento. Bolsas de filtro em branco foram pesadas, e após, pesou-se cerca de 2g de amostra liofilizada nas mesmas. As bolsas de filtro foram levadas à estufa em uma temperatura de 102 °C para remover a umidade. Após, foram inseridas no equipamento, por um tempo de extração de 60 minutos. As bolsas foram removidas do aparelho, levadas novamente a estufa a uma temperatura de 102 °C por 30 minutos para secagem, e pesadas. A análise foi realizada em triplicata. Os resultados foram expressos em gordura bruta por cento.

2.4.6 Determinação de Fibra Bruta

A análise foi realizada no analisador de fibras ANKOM A2000, seguindo as orientações descritas no manual do equipamento, e a metodologia proposta por Gomes et al. (2001). A análise foi realizada em triplicata. Os resultados foram expressos em fibra bruta por cento.

2.4.7 Determinação de sólidos solúveis (°Brix)

A análise foi realizada conforme a metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz (2008), com adaptações. Gotas da amostra foram adicionadas ao prisma do equipamento. Foi feita a leitura direta no mesmo. A análise foi realizada em triplicata.

2.5 Composição química

2.5.1 Compostos fenólicos totais

O conteúdo fenólico total foi determinado conforme o método de Folin-Ciocalteau, adaptado de Swain e Hillis (1959). Brevemente, uma alíquota de 50 µl do extrato ou controle (50 µl de etanol 98 %) foram combinados com 50 µl de reagente Folin-Ciocalteau 0,25 N. Após 3 min de reação, foram adicionados 100 µl de Na_2CO_3 (1 N) e as misturas foram incubadas durante 2 h à temperatura ambiente. Após, procedeu-se à leitura em leitora de placas (Spectra Max 190 - Molecular Devices) em um comprimento de onda de 725 nm. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (GAE 100 g^{-1} de peso fresco) utilizando uma curva padrão de ácido gálico (0 - 1 mg ml^{-1}).

2.5.2 Antocianinas totais

As antocianinas totais foram determinadas conforme método descrito por Fuleki e Francis (1968). Para tal, uma alíquota de 20 µL do extrato ou controle (20 µL de etanol) foram combinadas com 230 µL de etanol acidificado (p / v 85:15 etanol P.A. para HCl 1.5 N). Deixou-se reagir por 30 minutos em ambiente protegido da luz e procedeu-se a leitura em leitora de placas (Spectra Max 190 - Molecular Devices) em um comprimento de onda de 535 nm. A concentração de antocianinas foi calculada utilizando a curva padrão para cianidina-3-glicosídeo (0 – 1 mg / mL^{-1}).

2.5.3 Flavonoides Totais

O teor de flavonoides totais é determinado de acordo com o método proposto por Zhishen et al. (1999), com adaptações. À uma placa de 96 poços foram adicionados 120 µL de água destilada, 30 µL de cada extrato separadamente, 9 µL de $NaNO_2$ e aguardou-se reagir por 5 minutos. Após adicionou-se 9 µL de $AlCl_3$, e aguardou-se reagir por 6 minutos. Após este tempo, adicionou-se 60 µL de NaOH 1 mol/L e 72 µL de água destilada. Após, procedeu-se a leitura em leitora de placas (Spectra Max 190 - Molecular Devices) em um comprimento de onda de 510 nm. A concentração de flavonoides totais foi calculada utilizando a curva padrão de catequina (0 – 1mg / mL^{-1}).

2.6 Atividade antioxidante e inibição das enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase

2.6.1 Geral

As atividades *in vitro* dos extratos de frutas frente às enzimas alfa-glicosidase e alfa-amilase e a atividade antioxidante por captura dos radicais DPPH, hidroxila e óxido nítrico foram determinadas por métodos espectrofotométricos utilizando uma leitora de placas modelo Spectra Max 190 – Molecular Devices. Os valores de IC_{50} foram calculados utilizando pelo menos cinco concentrações de cada extrato. O percentual de inibição (I%) da enzima alfa-glicosidase e atividades antioxidantes pelos métodos citados foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$I = \frac{A_{controle} - A_{\text{amostra}}}{A_{controle}} \times 100$$

Onde $A_{controle}$ é a absorbância da reação do controle (contendo todos os reagentes exceto o extrato) e $A_{amostraple}$ é a absorbância do extrato testado na mistura de reação.

O percentual de inibição (I%) para o ensaio do potencial anti-hiperglicêmico através da enzima alfa-amilase foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$I\,\% = \frac{(A_{control} - A_{background1}) - (A_{sample} - A_{background2})}{(A_{control} - A_{background1}\ )} \times 100$$

Onde $A_{control}$ é a absorbância de 100 % da atividade da enzima (+ enzima - inhibitor); A_{sample} é o teste da amostra (+ enzyme + inhibitor); $A_{background1}$ é a absorção do amido devido à redução do açúcar (-enzyme − inhibitor) e $A_{background2}$ é o inibidor + o amido (-enzyme + inhibitor).

2.6.2 Inibição da alfa-glicosidase

A inibição da enzima alfa-glicosidase foi determinada utilizando o procedimento descrito por Vinholes et al. (2011) com algumas adaptações. Foram adicionados 10 µl de extrato enzimático em 50 µl de substrato p-nitrofenil-α-D-glicopiranosidio 3,25 mM (diluído em tampão fosfato pH 7,0). A reação iniciou-se pela adição de 50 µl da enzima (9,37 U mL^{-1} diluída em tampão fosfato, pH 7,0); a mistura foi incubada a 37 °C por 10 min e procedeu-se a leitura em leitora de placas Spectra Max – Molecular Devices em um comprimento de onda de 405 nm, imediatamente após o término da reação.

2.6.3 Inibição da alfa-amilase

A atividade frente à enzima alfa-amilase foi avaliada utilizando o procedimento descrito por Satoh et al. (2015) com algumas adaptações. O mix de reação foi composto de 15 µl de amostra, 50 µl de tampão fosfato (pH 7,0) e 12,5 µl da enzima alfa-amilase (241,71 U 62 mL^{-1}), seguido de incubação por 5 minutos à 37 ºC. A reação iniciou-se com a adição de 62,5 µl de amido solúvel como substrato, seguida de incubação por 15 minutos à 37ºC. Para cessar a reação utilizou-se 12,5 µl de ácido clorídrico 1 M. Para a formação de cor, adicionou-se 25 µl da solução de iodo (0,005 M) + iodeto de potássio (0,005 M). A leitura de absorbância foi feita em microplacas de poliestireno contendo 96 poços (Spectra Max 190 - Molecular Devives) a um comprimento de onda de 690 nm.

2.6.4 Atividade sequestrante do radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

A capacidade de doação de átomos de hidrogênio pelos compostos presentes nos extratos foi determinada por métodos já citados na literatura com algumas adaptações (Vinholes et al., 2011; Vinholes et al., 2014). Para tal, em uma microplaca de 96 poços foi adicionado 25 µL de solução de amostra (ou etanol, no caso do branco) e 250 µL de solução de DPPH 0.6 mM. As placas foram agitadas e incubadas no escuro por 30 minutos e posteriormente foi realizada leitura em leitora de placas Spectra Max 190, em comprimento de onda de 515 nm.

2.6.5 Atividade sequestrante do radical hidroxila

A capacidade de captura do radical hidroxila foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Vinholes et al., (2014) com adaptações. À uma placa de 96 poços foram adicionados 25 µL de extrato, 110 µL de solução de sulfato de ferro heptahidratado 8 mM, 50 µL de solução de peróxido de hidrogênio 7,18 mM, e posteriormente 74,2 µL de solução de ácido salicílico 3 mM. A placa foi agitada e incubada durante 30 minutos em uma temperatura de 37°C e após procedeu-se a leitura em leitora de placas Spectra Max 190, em um comprimento de onda de 515 nm.

2.6.6 Atividade sequestrante do radical óxido nítrico

A capacidade de captura do radical óxido nítrico foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Vinholes e al., (2011). À uma placa de 96 poços foram adicionados 50 µL de nitroprussiato de sódio (SNP 20 mM) e 50 µL do extrato. A mistura foi incubada em temperatura ambiente, sob efeito de luz por 60 minutos. Após, foi adicionado 50 µL de solução de ácido fosfórico 2% e 50 µL do reagente de Griess. A microplaca foi incubada durante 10 minutos no escuro a temperatura ambiente e após procedeu-se a leitura em leitora de placas Spectra Max 190, no comprimento de onda de 562 nm.

2.7 Análise estatística

Análises físico-químicas, compostos fenólicos totais, antocianinas totais e flavonoides totais, atividade antioxidante, e atividades enzimáticas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de t com 5% de significância, com o auxílio do software STATISTICA versão 6.1 (StatSoft, França).

A atividade (IC_{50}) dos extratos e frações das pequenas frutas foram expressos em mg / ml, e analisados através do programa GraphPad Prism. As análises foram realizadas em triplicata (n = 3) e expressas como ± média do erro padrão utilizando o programa Microsoft Excel.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização físico-química

No presente estudo (Tabela 1), houve variação da acidez de 0,582 % a 1,062 %, sendo que a safra 2017 obteve os teores mais elevados. O pH variou de 2,955 a 3,717, sendo este mais elevado no ciclo produtivo 2016. Os sólidos solúveis variaram de 4,800 a 12,367, e com exceção da cultivar Tupy, que apresentou maiores concentrações no ciclo produtivo 2016, as demais frutas apresentaram concentrações maiores no ciclo 2017. A umidade variou de 82,074 % a 91,520 %, sendo que as cultivares de amora-preta Tupy e Xingú apresentaram percentual de umidade maior na safra 2016, e as demais não diferiram entre os ciclos produtivos. O percentual de cinzas variou de 0,143 a 0,465, não havendo diferença significativa entre os ciclos produtivos, com exceção da cultivar O'Neal, que apresentou os melhores resultados no ciclo produtivo 2016. Gorduras totais (variação de 0,10 a 0,18) e Fibra bruta (variação de 0.886 a 3.197) não apresentaram diferença estatística significativa entre os dois ciclos produtivos.

Ornelas-Paz et al. (2013) avaliaram parâmetros de qualidade de morangos em diferentes estádios de amadurecimento, encontrando valores que variam de 6,6 a 9,0, valores de acidez 1,2 a 0,7 e pH de 3,39 a 3,80. Os valores encontrados neste estudo para morangos são semelhantes aos encontrados na literatura. Todos os atributos de qualidade de morangos são altamente influenciados pelo amadurecimento. Como fruta não-climatérica, os morangos devem ser colhidos em plena maturação, uma vez que não desenvolvem atributos de qualidade adequados para o consumo *in natura*. Este amadurecimento é afetado por fatores como cultivar e do modo de cultivo, dentre

outros fatores, o que explica as diferenças entre as duas cultivares avaliadas. Giampierri et al. (2012) afirmaram em seus estudos que o morango possui 90,95 % de umidade, 0,30 % de gorduras totais, 2,00 % de fibras e 0,40 % de cinzas. Os parâmetros de umidade e cinzas corroboram com os encontrados no estudo. Os valores para gordura e fibras foram menores do que os encontrados pelos autores.

Hirsch et al. (2012) avaliaram diferentes cultivares de amoras-pretas da região sul do Brasil encontrando valores de acidez entre 1,30 a 1,58 (% de ácido cítrico), pH variando de 2,78 a 3,08, e sólidos solúveis entre 7,3 a 10,2, teores semelhantes aos encontrados neste estudo. As concentrações lipídeos (0,15 a 0,30 %) encontrada pelos autores corrobora com as encontradas neste estudo, e o teor de fibras (5,5 a 5,8 %) encontrado pelos mesmos é mais elevado ao encontrado no presente estudo. A umidade (84,8 a 89,2) foi semelhante ao quantificado neste estudo, e o teor de cinzas (0,27 a 0,49) mais elevado.

Souza et al. (2014) avaliaram a composição química de mirtilos provenientes do Brasil, encontrando valores de acidez variando de 2,56 a 3,15 (% ácido cítrico), pH de 3,64 e teor de sólidos solúveis de 14,67. O valor de pH corrobora com o encontrado neste estudo, e o teor de acidez e sólidos solúveis encontrados foram menores. Os mesmos autores também citam que o mirtilo possui umidade de 87,7 %, teor de lipídeos de 0,19 %, teor de fibras de 1,9 % e teor de cinzas de 0,08 %. Os teores de umidade, gorduras e cinzas são semelhantes ao encontrado neste estudo, e o teor de fibras ligeiramente menor.

Tabela 1. Acidez, pH, sólidos solúveis, umidade, cinzas, gorduras totais e fibras contidos em cultivares de amora-preta, morango e mirtilo, em dois ciclos produtivos

Ciclo Produtivo	Cultivar	Acidez (% de ácido cítrico)	pH	Sólidos Solúveis	Umidade (%)	Cinzas (%)	Gorduras Totais (%)	Fibras (%)
	Tupy	0,582 ±0,685[b]	3,527 ± 0,015[a]	10,267 ± 0,208[a]	88,529 ± 0,394[a]	0,439 ± 0,008[a]	0,11 ± 0,004[a]	2,683 ± 0,288[a]
	Xingú	0,914 ± 0,274[b]	3,184 ± 0,050[a]	9,233 ±0,153[b]	84,074 ± 0,170[a]	0,446 ± 0,012[a]	0,10 ± 0,004[a]	2,931 ± 0,063[a]
2016	2011-6011	0,659 ± 0,261[b]	3,717 ± 0,004[a]	3,933 ± 0,153[b]	91,261 ± 0,139[a]	0,329 ± 0,011[a]	0,18 ± 0,002[a]	1,057 ± 0,063[a]
	Camarosa	0,760 ± 0,529[b]	3,403 ± 0,004[a]	4,800 ±0,173[b]	91,461 ± 0,029[a]	0,375 ± 0,010[a]	0,17 ± 0,006[a]	0,886 ± 0,083[a]
	O'Neal	0,600 ± 0,364[b]	3,360 ± 0,001[a]	9,833 ±0,058[a]	84,117 ± 0,196[a]	0,143 ± 0,005[a]	0,15 ± 0,008[a]	1,681 ± 0,196[a]
	Tupy	1,062 ± 0,561[a]	3,230 ± 0,165[b]	9,467 ± 0,153[b]	86,641 ± 0,265[b]	0,394 ± 0,038[a]	0,11 ± 0,006[a]	2,804 ± 0,478[a]
	Xingú	1,028 ± 0,572[a]	2,955 ± 0,017[b]	10,067 ± 0,058[a]	82,741± 0,369[b]	0,465 ± 0,011[a]	0,11 ± 0,021[a]	3,197 ± 0,201[a]
2017	2011-6011	0,915 ± 0,836[a]	3,545 ± 0,004[b]	6,433 ±0,115[a]	91,407 ± 0,074[a]	0,364 ± 0,015[a]	0,18 ± 0,005[a]	1,018 ± 0,029[a]
	Camarosa	1,041 ± 1,032[a]	3,311 ± 0,024[b]	6,467 ± 0,058[a]	91,520 ± 0,344[a]	0,369 ± 0,011[a]	0,18 ± 0,007[a]	0,915 ± 0,050[a]
	O'Neal	0,649 ± 0,332[a]	3,163 ± 0,099[b]	12,367 ± 0,058[a]	83,910 ± 0,154[a]	0,155 ± 0,025[b]	0,16 ± 0,007[a]	1,469 ± 0,065[a]

* Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença estatística.

**Resultados expressos em média ± desvio padrão.

3.2 Composição química

3.2.1 Compostos Fenólicos totais, antocianinas totais e flavonoides totais

Os extratos etanólicos apresentaram teores significativos de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e flavonoides totais (Tabela 2). A concentração de compostos fenólicos totais variou de 1256,71 a 2812,11 mg de ácido gálico / 100 g de fruto fresco, sendo que o ciclo produtivo 2016 apresentou as concentrações mais elevadas, com exceção da amora-preta da cultivar Tupy, que apresentou maior concentração no ciclo 2017. O teor de antocianinas totais entre as cultivares de amora-preta Tupy e Xingú e de mirtilo da cultivar O'Neal do ciclo produtivo 2016 apresentou as concentrações mais elevadas (variação de 124,84 a 202,21 mg de cianidina-3-glicosídeo / 100 g) e os genótipos de morango apresentaram concentração mais elevada na safra 2017 (variação de 55,50 a 77,25 mg de cianidina-3-glicosídeo / 100g). A concentração de flavonoides totais foi mais alta no ciclo produtivo 2017 (variação de 46,29 a 118,94 mg de catequina / 100 g), com exceção da cultivar de amora-preta Tupy, que apresentou concentração mais elevada na safra 2016 (128,48 mg de catequina / 100 g).

As pequenas frutas ricas em compostos fenólicos, incluindo flavonoides e antocianinas em muita atenção devido ao seu papel positivo na saúde humana e na prevenção de doenças. A estes compostos é atribuída a alta capacidade de eliminação de radicais livres medida por ensaios in vitro e in vivo (Veberic et al., 2014).

Dentre as frutas estudados, os maiores teores de compostos fenólicos foram dos morangos, da cultivar camarosa, seguido do mirtilo, e amora-preta. A fruta que apresentou maior teor de antocianinas totais, nos dois ciclos produtivos avaliados foram as amoras-pretas, seguidas do mirtilo e do morango. Os flavonoides totais foram variáveis em todos os genótipos testados, sendo que no ciclo produtivo 2016 o maior teor foi para a amora-preta, da cultivar Tupy e no ciclo produtivo 2017, o mirtilo. De forma geral, os dois ciclos produtivos diferiram estatisticamente em relação ao teor de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e flavonoides totais.

Tabela 2. Compostos fenólicos totais (CFT), antocianinas totais (AT) e flavonoides totais (FT) dos genótipos de morango, amora-preta e mirtilo nos dois ciclos produtivos.

	Amostra	**Ciclo Produtivo**	
		2016	2017
CFT*	Tupy	1305,04 ± 0,025[a]	1256,71 ± 0,003[b]
	Xingú	1674,27 ± 0,051[b]	1855,00 ± 0,051[a]
	O'Neal	2175,80 ± 0,035[a]	1917,41 ± 0,046[b]
	Camarosa	2812,11 ± 0,033[a]	2659,00 ± 0,061[b]
	2011-6011	1840,20 ± 0,021[a]	1827,00 ± 0,011[b]
AT**	Tupy	202,21 ± 0,037[a]	140,25 ± 0,015[b]
	Xingú	124,84 ± 0,037[a]	140,93 ± 0,025[a]
	O´Neal	154,14 ± 0,007[a]	150,95 ± 0,101[b]
	Camarosa	60,08 ± 0,005[b]	77,25 ± 0,004[a]
	2011-6011	55,50± 0,006[b]	65,93 ± 0,002[a]
FT***	Tupy	128,48 ± 0,001[a]	82,03 ± 0,011[b]
	Xingú	92,09 ± 0,011[b]	104,54 ± 0,015[a]
	O´Neal	93,04 ± 0,014[b]	118,94 ± 0,016[a]
	Camarosa	48,88 ± 0,003[b]	83,65 ± 0,021[a]
	2011-6011	46,29 ± 0,011[b]	59,69 ± 0,027[a]

* Compostos fenólicos totais (CFT) expressos como mg ácido gálico (100 g^{-1} de peso fresco);
** Antocianinas totais (AT) expressas em mg de cianidina-3-glicososídeo (100 g^{-1} peso fresco);
*** Flavonoides totais (FT) expresso em mg de catequina (100 g^{-1} peso fresco).
Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença estatística em relação a variável ciclo produtivo.

Huang et al. (2012) avaliou o teor de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e flavonoides totais de morango, amora-preta e mirtilo. Os teores de compostos fenólicos totais para mirtilo, amora-preta e morango foram de 944,00, 558,00 e 272,00 mg de ácido gálico em 100g de fruta fresca, respectivamente. O teor de flavonoides totais encontrado pelos autores para mirtilo, amora-preta e morango foram de 3608,00, 1183,00 e 704,00 mg em 100g de fruta fresca, respectivamente, teores maiores do que os encontrados neste estudo. O teor de antocianinas totais encontrado para mirtilo, amora-preta e morango foram de 2438,00, 399,00 e 116,00 mg em 100 g de fruta fresca, respectivamente, resultados superiores aos encontrados no estudo.

A composição química de frutas é afetada por diversos fatores, dentre eles o clima, solo, cultivar, dentre outros fatores. O solvente utilizado na extração também é

de suma importância. Estes fatores podem explicar as diferenças encontradas entre as frutas estudadas e os resultados encontrados na literatura.

3.2.2 Atividade antioxidante e inibição das enzimas alfa-glicosidase e alfa-amilase

As pequenas frutas estudadas (Tabela 3) obtiveram atividade antioxidante frente à todos os radicais testados, com exceção do genótipo de morango 2011-6011 para o radical óxido nítrico, nos dois ciclos produtivos e para o radical DPPH no ciclo produtivo 2016. Os valores de IC_{50} para captura do radical DPPH variaram de 108,42 239,47 mg / mL, sendo que o mirtilo da cultivar O'Neal (108.42 mg / mL) apresentou os melhores resultados. A acarbose não promoveu a captura do radical em nenhuma concentração testada, enquanto a quercetina apresentou inibição em uma concentração 3 vezes menor do que o a fruta com melhor resultado (mirtilo). Em relação à captura do radical hidroxila (OH), os valores de IC_{50} variaram de 10,55 a 217,94 mg / mL, sendo que a fruta que apresentou maior captura foi o morango, do acesso 2011-6011 (10,55 mg / mL) e a amora-preta da cultivar Tupy (60,55 mg / mL), ambos do ciclo produtivo 2017. A acarbose e a quercitia não promoveram a captura do radical em nenhum dos ciclos produtivos. O IC_{50} para a captura do radical óxido nítrico (ON) variou de 14,54 a 217,95, sendo que os melhores resultados foram observados na cultivar de amora-preta Xingú, em ambos os ciclos produtivos, com valores de 14,54 e 15,01 mg / mL para os ciclos 2016 e 2017, respectivamente. A quercetina e a acarbose não promoveram a captura do radical em nenhum dos ciclos testados.

Estudos que avaliem atividade antioxidante destas pequenas frutas frente ao radical óxido nítrico são escassos, porém muito importantes, já que o óxido nítrico é frequentemente detectado nos locais onde ocorrem processos inflamatórios. O mesmo exerce influência em várias funções, incluindo vasodilatação, neurotransmissão, plasticidade sináptica e memória no sistema nervoso central, no entanto, em condições patológicas, há uma superprodução do radical, que pode mediar efeitos tóxicos, como fragmentação de DNA, dano celular e morte celular neuronal. O mesmo também apresenta neurotoxicidade e atua como um mediador patológico em processos fisiopatológicos, como isquemia cerebral, epilepsia, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e outras doenças neurodegenerativas. Da mesma

forma, o estudo na captação do radical hidroxila é igualmente importante, devido ao mesmo ser a principal espécie reativa de oxigênio que induz a peroxidação lipídica e outros danos biológicos no organismo (Sumanont et al., 2004; Hazra et al., 2010).

Em relação a inibição das enzimas digestivas, os genótipos de pequenas frutas não atingiram a inibição de 50 % da enzima α-amilase, sendo então calculado o IC_{25}. As concentrações de inibição de 25 % do radical variaram de 0,99 a 487,17 mg / mL. Os melhores resultados na inibição da enzima foram observados na cultivar Tupy, em ambos os ciclos produtivos (0,99 e 14,16 para os ciclos 2016 e 2017, respectivamente). Em comparação com os controles, a amora-preta da cultivar Tupy e ciclo 2017 obteve inibição 7 vezes maior que a acarbose e 17 vezes menor que a quercetina.

A concentração de inibição de 50 % da enzima α-glicosidase (IC_{50}) variou de (62,49 a 475,79 mg / mL), sendo que a cultivar de amora-preta Tupy do ciclo produtivo 2016 apresentou os melhores resultados (62,49 mg / mL), sendo estes melhores que os da quercetina, que não apresentou inibição, e inibição 4 vezes menor que a acarbose.

Existem evidências de que os polifenóis podem modular a disponibilidade de nutrientes através da inibição de enzimas digestivas envolvidas na quebra de lipídios e amido, o que poderia influenciar no combate à obesidade e controle glicêmico (McDougall et al., 2008; McDougall et al. Stewart, 2009). Cheplick et al., (2010) avaliaram atividade de extratos de diferentes cultivares de de morango frente às enzimas α-amilase e α-glicosidase, encontrando uma inibição satisfatória para a α-glicosidase e baixa inibição para a α-amilase. Já Pallavi et al. (2010) em seu estudo que avaliou a atividade de extratos aquosos de morango frente à estas enzimas observou um comportamento semelhante, ou seja, a inibição foi mais efetiva foi frente à α- glicosidase, e inferior para a α-amilase. Neste estudo o comportamento dos extratos foi semelhante, não sendo atingida a inibição de 50 % frente à alfa-amilase, calculando-se, então, o IC_{25}.

Wang et al., (2012b) avaliou diferentes genótipos de mirtilo frente à enzima α-glicosidase, observando que a casca possuía uma atividade inibitória da alfa-glicosidase mais elevada do que a polpa em todas as amostras testadas, demonstrando a importância do consumo da fruta *in natura* para a promoção da saúde. Wu et al. (2017) avaliou diferentes cultivares de mirtilo quanto ao teor de

compostos bioativos e atividade antioxidante e frente à enzima α-glicosidase verificando forte inibição da enzima e correlação com a atividade antioxidante.

Tabela 3. Inibição da enzima alfa-amilase, expressa em IC_{25} e alfa-glicosidase, atividade antioxidante pela captura dos radicais DPPH, hidroxila e óxido nítrico, expressas em IC_{50}.

		IC_{25}		IC_{50}		
	Genótipo	**α-amilase (mg/mL)**	**α-glicosidase (mg/mL)**	**DPPH (mg/mL)**	**Hidroxila (mg/mL)**	**Óxido Nítrico (mg/mL)**
2016	2011-6011	438,42 ± 7,89	435,78 ± 13,61	ND	86,51 ± 16,39	ND
	Camarosa	474,16 ± 20,97	469,12 ± 18,49	201,10 ± 13,28	217,94 ± 18,25	217,95 ± 18,25
	O´Neal	62,35 ± 7,79	421,06 ± 16,66	108,42 ± 16,99	124,30 ± 24,11	124,30 ± 26,52
	Tupy	14,16 ± 9,27	62,49 ± 21,31	153,68 ± 33,07	76,35 ± 18,84	174,42 ± 18,76
	Xingú	407,78 ± 16,14	480,08 ± 9,29	239,47 ± 23,52	104,84 ± 23,63	14,54 ± 11,31
2017	2011-6011	487,17 ± 8,05	475,79 ±17,87	226,21 ± 28,56	10,55 ± 20,07	ND
	Camarosa	453,65 ± 20,58	452,37 ± 10,96	125,04 ± 32,10	106,46 ± 31,57	124,82 ± 31,82
	O´Neal	340,69 ± 6,08	105,52 ± 10,69	181,03 ± 22,00	160,98 ± 23,90	160,98 ± 23,90
	Tupy	0,99 ± 4,79	301,60 ± 17,56	199,63 ± 25,82	60,55 ± 24,04	66,93 ± 19,54
	Xingú	228,19 ± 23,65	166,57 ± 8,35	120,33 ± 30,49	145,60 ± 21,56	15,01 ± 11,21
Controles positivos						
	Acarbose	7,13 ± 9,40	16,88 ± 10,69	ND	ND	ND
	Quercetina	17,52 ± 4,26	ND	34,16 ± 31,96	ND	ND

*ND – Não detectado

*Resultados expressos em média ± desvio padrão.

4. Conclusão

Os extratos de morango, principalmente da cultivar camarosa, amora-preta e mirtilo possuem características físico-químicas semelhantes às encontradas na literatura, concentrações significativas de compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides totais.

Com exceção do acesso de morango 2011-6011 que não possui capacidade de capturar o radical óxido nítrico nos dois ciclos produtivos avaliados, e no ciclo 2016 para o radical DPPH, os extratos de frutas estudados possuem atividade antioxidante frente à diferentes radicais livres.

As mesmas são capazes de inibir as enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase, de formas distintas, com destaque para a cultivar Tupy do ciclo 2017 que inibiu a α-amilase em concentração 7 vezes mais baixa que a acarbose e 17 vezes mais baixa que a quercetina. Esta cultivar também se destacou na inibição da alfa-glicosidase, no ciclo produtivo 2016, inibindo a enzima, ao contrário da quercetina, que não possui inibição, e apresentando um IC_{50} para a enzima 4 vezes maior que a acarbose. A ingestão destas frutas ocasiona benefícios maiores do que a acarbose, que não possui atividade antioxidante frente à nenhum dos radicais livres testados. Os resultados obtidos mostram que estas frutas podem auxiliar na prevenção e tratamento da DM2.

5. Referências Bibliográficas

Cheng, A. Y., & Josse, R. G. (2004). Intestinal absorption inhibitors for type 2 diabetes mellitus: prevention and treatment. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, *1*(2), 201-206.

Cheplick, S., Kwon, Y.-I., Bhowmik, P., & Shetty, K. (2010). Phenolic-linked variation in strawberry cultivars for potential dietary management of hyperglycemia and related complications of hypertension. *Bioresource Technology*, 101(1), 404–413.

Ercisli, S., Orhan, E., Ozdemir, O., & Sengul, M. (2007). The genotypic effects on the chemical composition and antioxidant activity of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) berries grown in Turkey. *Scientia Horticulturae, 115(1), 27–33.*

Fuleki, T.; Francis, F. T. (1968). Quantitative methods for anthocyanins 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 33, p. 72-77.

Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition, 28(1), 9–19.*

Gomes, J.C; Oliveira, G.F. **Análise de físico-quimica de alimentos**. Viçosa: Editora UFV, 2001, 188p.

Hazra, B., Sarkar, R., Biswas, S., & Mandal, N. (2010). Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of Terminalia chebula, Terminalia belerica and Emblica officinalis. *BMC Complementary and alternative medicine*, *10*(1), 20.

Hirsch, G. E., Facco, E. M. P., Rodrigues, D. B., Vizzotto, M., & Emanuelli, T. (2012). Caracterização físico-química de variedades de amora-preta da região sul do Brasil. *Ciência Rural*, *42*(5).

Huang, W., Zhang, H., Liu, W., & Li, C. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 13(2), 94–102.*

Instituto Adolf Lutz. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020.

Mandave, P., Khadke, S., Karandikar, M., Pandit, V., Ranjekar, P., Kuvalekar, A., & Mantri, N. (2017). Antidiabetic, Lipid Normalizing, and Nephroprotective Actions of the Strawberry: A Potent Supplementary Fruit. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 124.

McDougall, G. J., Kulkarni, N. N., & Stewart, D. (2008). Current developments on the inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*, *34*(1), 73-80.

McDougall, G. J., Kulkarni, N. N., & Stewart, D. (2009). Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chemistry*, *115*(1), 193-199.

Ornelas-Paz, J. de J., Yahia, E. M., Ramírez-Bustamante, N., Pérez-Martínez, J. D., Escalante-Minakata, M. del P., Ibarra-Junquera, V., … Ochoa-Reyes, E. (2013). Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (Fragaria x ananassa Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry, 138(1), 372–381.*

Pallavi, M., Rani, H., Kuvalekar, A., & Ranjekar, P. (2013). Antiglycation, antioxidant and antidiabetic activity of mature Strawberry (Fragaria× ananassa) fruits. *International*

Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. v. 4 issue 4.

Peinado, I., Rosa, E., Heredia, A., & Andrés, A. (2012). Rheological characteristics of healthy sugar substituted spreadable strawberry product. *Journal of foodengineering*, *113*(3), 365-373.

Satoh, T., Igarashi, M., Yamada, S., Takahashi, N., & Watanabe, K. (2015). Inhibitory effect of black tea and its combination with acarbose on small intestinal a-glucosidase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 161, 147–155.

Shi, M., Loftus, H., McAinch, A. J., & Su, X. Q. (2017). Blueberry as a source of bioactive compounds for the treatment of obesity, type 2 diabetes and chronic inflammation. *Journal of Functional Foods*, *30*, 16-29.

Sumanont, Y., Murakami, Y., Tohda, M., Vajragupta, O., Matsumoto, K., & Watanabe, H. (2004). Evaluation of the nitric oxide radical scavenging activity of manganese complexes of curcumin and its derivative. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *27*(2), 170-173.

Swain, T.; Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica* I.- The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of Science and Food Agriculture*. Washington, v. 10, p. 63-68.

Tulipani, S., Marzban, G., Herndl, A., Laimer, M., Mezzetti, B., & Battino, M. (2011). Influence of environmental and genetic factors on health-related compounds in strawberry. *Food Chemistry*, *124*(3), 906-913.

Veberic, R., Stampar, F., Schmitzer, V., Cunja, V., Zupan, A., Koron, D., & Mikulic-Petkovsek, M. (2014). Changes in the contents of anthocyanins and other compounds in blackberry fruits due to freezing and long-term frozen storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, *62*(29), 6926-6935.

Vinholes, J., Gonçalves, P., Martel, F., Coimbra, M. A., & Rocha, S. M. (2014). Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. Food Chemistry, 156, 204–211.

Vinholes, J., Grosso, C., Andrade, P. B., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., Pinho, P. G. D., & Ferreres, F. (2011). In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of Spergularia rubra. Food Chemistry, 129(2), 454–462.

Wang, S. Y., Chen, H., Camp, M. J., & Ehlenfeldt, M. K. (2012a). Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of

rabbiteye blueberry (Vaccinium ashei Reade). *Food Chemistry*, *132*(2), 855-864.

Wang, S. Y., Camp, M. J., & Ehlenfeldt, M. K. (2012b). Antioxidant capacity and α-glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (Vaccinium spp.) cultivars. *Food Chemistry*, *132*(4), 1759-1768.

Weinert, L. S., Camargo, E. G., & Silveiro, S. P. (2015). Tratamento medicamentoso da hiperglicemia no diabetes melito tipo 2. *Clinical & Biomedical Research*, *30*(4).

Wu, Y., Zhou, Q., Chen, X. Y., Li, X., Wang, Y., & Zhang, J. L. (2017). Comparison and screening of bioactive phenolic compounds in different blueberry cultivars: evaluation of anti-oxidation and α-glucosidase inhibition effect. *Food Research International*, *100*, 312-324.

Yamagishi, S. I., Matsui, T., Ueda, S., Fukami, K., & Okuda, S. (2009). Clinical utility of acarbose, an α-glucosidase inhibitor in cardiometabolic disorders. *Current drug metabolism*, *10*(2), 159-163.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, *64*(4), 555-559.

Considerações Finais

Neste estudo pode-se esclarecer dúvidas acerca da atividade biológicas das mesmas, tanto através da revisão da literatura, quanto na parte experimental realizada. Obteve-se a caracterização química, atividade antioxidante e atividade frente às enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase, bem como pode-se demonstrar que algumas destas variáveis são significativamente afetadas pelo ciclo produtivo avaliado, principalmente pelas condições edafoclimáticas.

Como complemento, será adicionado à pesquisa a quantificação de compostos fenólicos individuais, nos genótipos em ambos os ciclos produtivos, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (em fase de execução).