

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Faculdade de Nutrição**

**Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos**



**Dissertação**

**Características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas de genótipos e cultivares comerciais de frutos de mirtilheiro (*Vaccinium spp.*)**

**Amanda Radmann Bergmann**

**Pelotas, 2021**

**Amanda Radmann Bergmann**

**Características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas de genótipos e cultivares comerciais de frutos de mirtilheiro (*Vaccinium spp.*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabete Helbig

Coorientadoras: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Catia Silveira da Silva

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Doralice Lobato de Oliveira Fischer

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

B498c Bergmann, Amanda Radmann

Características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas de genótipos e cultivares comerciais de frutos de mirtilheiro (*Vaccinium spp.*) / Amanda Radmann Bergmann ; Elizabete Helbig, orientadora ; Catia Silveira da Silva, Doralice Lobato de Oliveira Fischer, coorientadoras. – Pelotas, 2021.

109 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Antocianinas. 2. Fitoquímicos. 3. Pequenos frutos. 4. Variabilidade genética. 5. *Vaccinium ashei* reade. I. Helbig, Elizabete, orient. II. Silva, Catia Silveira da, coorient. III. Fischer, Doralice Lobato de Oliveira, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Amanda Radmann Bergmann

Características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas de genótipos e cultivares comerciais de frutos de mirtilheiro (*Vaccinium* spp.)

Dissertação, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 05 de agosto de 2021.

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Elizabete Helbig (orientadora). Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Caroline Dellinghausen Borges. Doutora em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Brauer Zaicovski. Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula do Sacramento Wally. Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

**À minha família por todo apoio e amor que  
sempre recebi.**

## **Agradecimentos**

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos e à Universidade Federal de Pelotas pela possibilidade de realizar o mestrado.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabete Helbig, pela oportunidade de realização deste estudo, pela orientação, apoio e confiança.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Doralice Lobato de Oliveira Fischer, minha coorientadora, a qual orientou-me com empenho em todas as etapas da pesquisa. Obrigada pelos grandes ensinamentos, por todo o carinho e por fazer-se sempre presente.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Catia Silveira da Silva, minha coorientadora, pela oportunidade e apoio.

Aos meus pais, Anelise e Sérgio, por todo o amor, pela formação, incentivo e apoio em todas as minhas decisões.

À minha irmã, Luiza, pela amizade e por sempre acreditar em mim.

Ao Lucas de Oliveira Fischer, por estar sempre ao meu lado, apoiando-me a ir em busca dos meus sonhos e principalmente por todo amor e carinho.

Às minhas amigas, por todo companheirismo e amizade.

À doutoranda Tatiane Siebeneichler, por todo o auxílio dado a mim nesta jornada, além dos valiosos ensinamentos e contribuições. Sou muito grata por toda tua dedicação, carinho e orientação. Obrigada!

Ao Prof. Dr. César Valmor Rombaldi, pela colaboração e auxílio.

Por fim, ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, especialmente ao Laboratório de Fisiologia de Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças, ao qual concedeu-me o espaço e tornou viável a realização deste trabalho.

*“Que seu remédio seja seu alimento,  
e que seu alimento seja seu remédio.”  
Hipócrates*

## Resumo

BERGMANN, Amanda Radmann. **Características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas de genótipos e cultivares comerciais de mirtilheiro (*Vaccinium* spp.)**. 2021. 109 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Os frutos do mirtilheiro possuem teores elevados de antioxidantes, compostos fenólicos e antocianinas, conferindo assim, propriedades funcionais aos mesmos. No entanto, o conteúdo desses compostos pode apresentar variabilidade de acordo com as características edafoclimáticas da região, condições de cultivo, além das diferenças genéticas inerentes aos genótipos de diferentes cultivares e seleções. Portanto, com este estudo objetivou-se analisar e comparar as características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas dos frutos oriundos de seis genótipos selecionados (BB3, BB4, BB6, PW1, PW2 e PW5) em relação a sete cultivares comerciais (Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Climax, Delite, Powderblue e Woodard), oriundos do ciclo de produção 2019/2020. O experimento foi conduzido a campo, com frutos provenientes de uma área experimental, localizada no terceiro distrito de Pelotas, RS, e no Laboratório de Fisiologia de Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), onde foram realizadas as avaliações. Para a realização das análises foram colhidos, aproximadamente, 1 kg de frutos em estágio completo de maturação de cada genótipo e em três clones de cada cultivar comercial escolhidos aleatoriamente. As amostras utilizadas nas análises de cor, sólidos solúveis, pH e acidez titulável foram pesadas e separadas por repetição (R1, R2 e R3), contendo 100 g de frutos em massa úmida. Já para a quantificação dos antioxidantes (DPPH e ABTS), compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas totais e antocianinas individuais, foram pesados e separados 200 g de frutos em massa seca por repetição. Os resultados indicam que os genótipos e as cultivares avaliadas, conferiram altos teores de antioxidantes, fenólicos, flavonoides, antocianinas totais e individuais. Destacando-se 'Bluegem', 'Briteblue', 'Climax', 'Delite' e os genótipos PW1, PW2, PW5 e BB3. Concluiu-se que os genótipos estudados não apresentaram superioridade em relação aos seus genitores e possíveis genitores. Porém, os mesmos possuem tanto potencial funcional quanto as cultivares já consolidadas no mercado. Além de possivelmente, possuírem maior adaptação às condições edafoclimáticas da região Sul do Brasil, uma vez que foram cultivadas e selecionadas no Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: Antocianinas. Fitoquímicos. Pequenos frutos. Variabilidade genética. *Vaccinium ashei* Reade.

## Abstract

BERGMANN, Amanda Radmann. **Physico-chemical, antioxidant and phenolic characteristics of blueberry genotypes and commercial cultivars (*Vaccinium spp.*)**. 2021. 109 f. Dissertation (Master in Nutrition and Food) - Graduate Program in Nutrition and Food, Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Blueberry fruits have high levels of antioxidants, phenolic compounds and anthocyanins, thus giving them functional properties. However, the content of these compounds may vary according to the edaphoclimatic characteristics of the region, growing conditions, in addition to genetic differences inherent to the genotypes of different cultivars and selections. Therefore, this study aimed to analyze and compare the physicochemical, antioxidant and phenolic characteristics of fruits from six selected genotypes (BB3, BB4, BB6, PW1, PW2 and PW5) in relation to seven commercial cultivars (Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Climax, Delite, Powderblue and Woodard), from the 2019/2020 production cycle. The experiment was conducted in the field, with fruits from an experimental area, located in the third district of Pelotas, RS, and at the Postharvest Physiology Laboratory of Fruits and Vegetables, of the Department of Agroindustrial Science and Technology (DCTA), from the Faculty of Agronomy Eliseu Maciel (FAEM), where the evaluations were carried out. To carry out the analysis, approximately 1 kg of fruits in complete maturity stage of each genotype and in three randomly chosen clones of each cultivar were collected. The samples used in the analysis of color, soluble solids, pH and total titratable acidity were weighed and separated by repetition (R1, R2 and R3), containing 100 g of fruits in wet mass. For the quantification of antioxidants (DPPH and ABTS), total phenolic compounds, total flavonoids, total anthocyanins and individual anthocyanins, 200 g of fruits in dry mass were weighed and separated by repetition. Results indicate that the genotypes and cultivars evaluated provided high levels of antioxidants, phenolics, flavonoids, total and individual anthocyanins. Highlighting 'Bluegem', 'Briteblue', 'Climax', 'Delite' and the PW1, PW2, PW5 and BB3 genotypes. It was concluded that the studied genotypes did not show superiority in relation to their parents and possible parents. However, they have as much functional potential as the cultivars already consolidated in the market. In addition to possibly having greater adaptation to the edaphoclimatic conditions of southern Brazil, since they were cultivated and selected in Rio Grande do Sul.

Keywords: Anthocyanins. Phytochemicals. Small fruits. Genetic variability. *Vaccinium ashei* Reade.

## Lista de Tabelas

- Tabela 1 Parâmetros físico-químicos (pH, ATT, SS, SS/ATT e Cor (°Hue) em frutos de mirtilheiro, oriundos de sete cultivares comerciais e seis genótipos..... 105
- Tabela 2 Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas totais em frutos de mirtilheiro, oriundos de sete cultivares comerciais e seis genótipos.....106
- Tabela 3 Atividade antioxidante em frutos de mirtilheiro por meio dos protocolos DPPH e ABTS, oriundos de sete cultivares comerciais e seis genótipos.....107
- Tabela 4 Quantificação de antocianinas individuais (malvidina-3-O-glicosídeo; malvidina-3-O-galactosídeo; cianidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-galactosídeo; delphinidina-3-O-galactosídeo) em frutos de mirtilheiro, oriundos de sete cultivares comerciais.....108
- Tabela 5 Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis pH, Acidez titulável (AT), Sólidos Solúveis (SS), relação SS/AT, °Hue, DPPH, ABTS, Fenólicos Totais, Flavonoides Totais e Antocianinas Totais.....109

## Sumário

1 Introdução.....	13
2 Revisão bibliográfica.....	14
1 PROJETO DE PESQUISA.....	27
1 Introdução.....	33
2 Revisão bibliográfica.....	35
2.1 Pequenos frutos e mirtilo ( <i>Vaccinium</i> spp.).....	35
2.2 Características físico-químicas dos frutos e fenologia das cultivares.....	37
2.3 Melhoramento genético da espécie.....	41
2.4 Propriedades antioxidantes.....	42
2.5 Compostos fenólicos.....	44
2.6 Antocianinas.....	45
2.7 Formas de consumo.....	47
2.8 Propriedades químicas, antioxidantes e fenólicas de diferentes cultivares de mirtilo.....	47
2.9 Efeitos benéficos na saúde humana.....	49
3 Conclusão geral revisão bibliográfica.....	51
4 Hipótese.....	52
5 Justificativa.....	53
6 Objetivos.....	54
6.1 Objetivo geral.....	54
6.2 Objetivos específicos.....	54
7 Delineamento experimental.....	55
8 Materiais e métodos.....	56
Cor.....	56
Sólidos solúveis.....	57
Acidez titulável.....	57
Relação SS/ATT .....	57
pH.....	57
Capacidade antioxidante pelo método do DPPH.....	57
Análise antioxidante pela captura do radical livre ABTS .....	58
Determinação de compostos fenólicos totais pelo protocolo Folin-Ciocalteu.....	58
Determinação de antocianinas monoméricas totais.....	59
Determinação de antocianinas individuais.....	59

8.1 Origem dos genótipos.....	62
9 Resultados esperados.....	62
10 Cronograma.....	63
11 Orçamento.....	64
Referências .....	65
<b>2 RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO.....</b>	<b>73</b>
1 Logística do trabalho de campo.....	74
2 Modificações do projeto de pesquisa.....	74
3 Digitação e processamento de dados.....	75
4 Resultados gerais.....	75
<b>3 ARTIGO.....</b>	<b>76</b>
Resumo.....	79
1 Introdução.....	80
2 Material e métodos.....	81
3 Resultados e discussão.....	87
Conclusão.....	97
Referências.....	98

## 1 Introdução

O mirtilo (*Vaccinium* spp.) é um pequeno fruto pertencente à família Ericaceae, subfamília Vaccinoideae e gênero *Vaccinium* (RASEIRA et al., 2004). Seu cultivo ainda é recente no Brasil, porém tem se destacado cada vez mais em virtude dos elevados teores de atividade antioxidante, principalmente pelos compostos fenólicos presentes em sua composição (PERTUZZATI et al., 2021).

A partir disso, sugere-se que o mirtilo é um fruto com alto potencial funcional, atraindo tanto os consumidores quanto os produtores. Porém, a variabilidade e a quantidade desses compostos dependem de alguns fatores, como as características edafoclimáticas da região de cultivo, ou seja, condições de clima e solo, bem como o manejo e tratos culturais das plantas, além das características genéticas existentes entre as cultivares (SKOVANKOVA et al., 2015).

Os frutos utilizados no presente estudo são provenientes de um matrizeiro com 18 anos de idade, formado por sete cultivares comerciais (Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Climax, Delite, Powderblue e Woodard) e de seis genótipos com 13 anos de idade (BB3, BB4, BB6, PW1, PW2 e PW5) oriundos de uma área experimental, localizada no terceiro distrito de Pelotas, RS, a 31° 33' 4,13" S, 52° 23' 54,13" W e 120 m de altitude. Sendo duas destas 'Bluebelle' e 'Powderblue' utilizadas para a extração das sementes que originaram os genótipos (BB3, BB4, BB6, PW1, PW2 e PW5), selecionados por meio de seleção massal em pesquisa anterior, também objetos deste estudo.

Portanto, objetivou-se com o estudo analisar e comparar as características físico-químicas dos frutos de seis genótipos selecionados (BB3, BB4, BB6, PW1, PW2 e PW5) em relação a sete cultivares comerciais (Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Climax, Delite, Powderblue e Woodard) de mirtilheiro, oriundos do ciclo de produção que abrange o período de novembro/2019 a janeiro/2020.

## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Pequenos frutos e mirtilo (*Vaccinium spp.*)

O conceito “pequenos frutos” ou “berries”, é utilizado na literatura internacional quando se refere à várias culturas, como exemplo a do morangueiro, amoreira preta, framboeseira, groselheira, mirtilheiro, entre outras (ANTUNES, 2002).

A produtividade desses frutos nativos de clima temperado por área é alta, as exportações têm crescido nos últimos anos, assim como a área plantada e em muitas regiões é considerada uma importante alternativa, tanto para os pequenos produtores como para as grandes empresas (PAYNE, 2005).

A demanda por esses frutos tem aumentado muito nos últimos anos, pois são ricos em propriedades benéficas ao organismo humano, apresentando elevados teores de substâncias antioxidantes e anticancerígenas, atraindo assim o consumidor e o produtor. Dentre essas frutíferas, o mirtilo é classificado como o fruto que possui a maior quantidade de antioxidantes já estudada, pois contém um elevado teor de polifenóis tanto na casca quanto na polpa. Sua disponibilidade e versatilidade permitem que seja incorporada em uma ampla variedade de formulações (PAYNE, 2005).

O mirtilheiro pertence à família Ericaceae, subfamília Vaccinoideae e gênero *Vaccinium*. É nativo da América do Norte, Estados Unidos e Canadá, onde é denominado "blueberry" (RASEIRA, 2004).

No Brasil, o cultivo é ainda recente e pouco conhecido. As primeiras plantas da cultura foram trazidas em 1983 pela Embrapa Clima Temperado de Pelotas (RS), com a introdução da coleção de cultivares de baixa exigência em frio do grupo rabbiteye, oriundas da Universidade da Flórida. A região de Vacaria (RS), em 1990 foi pioneira na produção comercial e é a grande referência em termos de produção (HOFFMANN, 2004; RASEIRA, 2006; SILVA et al., 2008).

A área cultivada no Brasil ultrapassa 150 hectares, sendo praticamente toda a produção destinada à exportação. O Rio Grande do Sul (RS) é o estado que mais se destaca na produção, com 45 produtores em uma área de 65 ha, produzem um total de 150 toneladas (FACHINELLO, 2008).

As plantas apresentam porte arbustivo, com hábito de crescimento basitônico, ou seja, as brotações que dão origem as hastes principais ocorrem,

preferencialmente, nas gemas basais. Fator esse, que define o porte da planta (RASEIRA, 2004).

Dentre os cinco grupos mais importantes (highbush, half high, southern highbush, rabbiteye e lowbush) dois se destacam, rabbiteye e highbush. As cultivares do primeiro grupo adaptam-se em regiões de pouco frio (cerca de 300 horas de frio), enquanto as do segundo em regiões mais frias, que geralmente coincidem com as de maior altitude. No Brasil, as principais cultivares implantadas pertencem ao grupo rabbiteye, devido à baixa necessidade em horas de frio. As plantas desse grupo podem alcançar de dois a quatro metros de altura e apresentam as seguintes características: vigor, longevidade, produtividade, tolerância ao calor e à seca, variações de solo, baixa necessidade de frio, produzindo assim frutos mais ácidos quando comparados ao do grupo highbush, que são firmes e de longa conservação (RASEIRA, 2004).

Entre as limitações das cultivares do grupo rabbiteye, destaca-se a completa coloração do fruto antes do ponto ideal da colheita, onde estaria com melhor qualidade em relação ao sabor, a tendência de rachar a película em períodos úmidos e o longo período até alcançar o máximo de produtividade (ANTUNES et al., 2008).

O fruto é não climatérico, ou seja, a velocidade respiratória diminui gradativamente da colheita à senescência. Como os frutos não amadurecem após serem colhidos, deve-se realizar a colheita no estágio ideal de maturação para o consumo (SOUSA et al., 2007).

Seus frutos são de cor azul intensa, recobertas de cera (pruína), baciforme e globulosa, sumarenta e apresentam um sabor agridoce, com diâmetro que varia entre 1,5 a 2,5 cm, além de conter diversas sementes de tamanho pequeno (HOFFMANN; ANTUNES, 2004). Possui cicatriz localizada diametralmente oposta ao ápice, de dimensão e formato variáveis, conforme a espécie e a cultivar (SOUZA et al., 2007).

## **2.2 Características físico-químicas dos frutos e fenologia das cultivares**

A caracterização físico-química dos frutos e a fenologia de floração e maturação provenientes de sete cultivares foi realizada na Embrapa Clima Temperado, por Raseira (2004) e Antunes et al. (2008), conforme descrição abaixo.

**Bluebelle:** originária da Geórgia, é auto fértil, mede de 1,0 a 1,7 cm de diâmetro. Apresenta frutos firmes, de tamanho pequeno a médio, com peso médio de

2,2 g. O sabor é doce e ácido, predominando a acidez. A película é escura com presença moderada de pruína. O teor médio de sólidos solúveis é de 11,5° Brix. O início da floração ocorre de 15 a 25 de agosto e a maturação entre 3 a 14 de dezembro, finalizando de 20 a 31 de janeiro.

**Bluegem:** é uma cultivar originária da Flórida. Proveniente de polinização livre, necessita de polinização cruzada, sendo Woodard uma das polinizadoras recomendadas. Os frutos são de tamanho médio, contém muita pruína e são muito saborosas, com diâmetro de 1,0 e 1,6 cm e peso médio em torno de 1,3 g. O teor de sólidos solúveis varia entre 10,5 a 12,6° Brix. Inicia o florescimento entre 10 a 25 de agosto e a maturação dos frutos entre 8 a 14 de dezembro, finalizando de 20 a 26 de janeiro.

**Briteblue:** oriunda da Geórgia, seus frutos medem acima de 1,3 cm de diâmetro, apresentam tamanho grande, com película azul clara, boa firmeza e sabor regular. O peso e o diâmetro dos frutos variam de 1,3 a 1,6 g e 1,0 a 1,7 cm, respectivamente, apresentando teor de sólidos solúveis entre 9,2 e 11,3° Brix. O início da floração varia entre 10 a 25 de agosto e a colheita ocorre de 9 a 14 de dezembro, finalizando de 20 a 26 de janeiro.

**Climax:** também originária da Geórgia, é proveniente de um cruzamento entre 'Callaway' e 'Ethel'. Os frutos apresentam tamanho médio, com película azul escura e sabor doce e ácido. O diâmetro dos frutos varia de 1 a 1,5 cm com peso médio de 1,8 g, a película apresenta muita pruína, dando ao fruto um aspecto bem azulado. O teor de sólidos solúveis varia entre 10 e 12,4° Brix. O início da floração ocorre entre 10 a 25 de agosto e o início da maturação no início da primeira quinzena de dezembro, finalizando de 7 a 26 de janeiro.

**Delite:** originária da Geórgia, é oriunda do cruzamento de duas seleções: T14 e T15. Os frutos são excelentes, geralmente de tamanho pequeno a médio, variando entre 1,2 e 1,8 cm de diâmetro com peso médio dos frutos de 1,2 g. A película apresenta menos pruína do que os frutos da cv. Climax, sendo bem escura. O teor de sólidos solúveis varia entre 10,8 a 12,5° Brix. A floração ocorre de 10 a 25 de agosto e o amadurecimento dos frutos de 14 a 20 de dezembro, finalizando de 7 a 31 de janeiro.

**Powderblue:** originária de Maryland, os frutos são de tamanho médio, com diâmetro entre 1,2 a 1,5 cm e peso médio dos frutos de 1, 2 g. Apresentam sabor ótimo, caracterizado como doce e ácido equilibrado. É uma das cultivares que

apresentam maior quantidade de pruína e possui película azul clara. As plantas são resistentes a doenças, muito produtivas e vigorosas. O teor de sólidos solúveis varia entre 11 a 11,7° Brix. A floração ocorre de 10 a 30 de agosto e a colheita dos frutos varia entre 14 a 22 de dezembro, podendo finalizar de 20 a 31 de janeiro.

**Woodard:** cultivar originária da Geórgia, oriunda do cruzamento entre 'Ethel' e 'Callaway'. Os frutos são de tamanho grande com a película azul clara. Apresentam pouca firmeza, portanto, inadequados para serem transportados a longas distâncias. O diâmetro varia de 1,1 a 1,5 cm, com peso médio entre 1,0 a 1,2 g. Apresentam teor de sólidos solúveis superior a 12° Brix, podendo alcançar até 13,9° Brix. O período de floração desta cultivar tem início no dia 10 de agosto e pode estender até o dia 28 de agosto, já a maturação inicia de 9 a 14 de dezembro, finalizado entre 20 a 26 de janeiro.

### **2.3 Melhoramento genético da espécie**

O melhoramento genético de frutíferas é uma área de extrema importância que está crescendo muito no Brasil, por proporcionar o desenvolvimento de culturas altamente produtivas que geram frutos saudáveis e com alta qualidade, além de promover o mínimo possível de agressão ao meio ambiente.

Esses programas têm como objetivo principal desenvolver tanto cultivares-copa quanto porta-enxertos que possam contribuir para melhorar a produtividade, a qualidade e a maior oferta de frutos, atendendo assim as necessidades da cadeia produtiva, na qual engloba a produção, transporte, comércio, indústria e consumidores.

A variabilidade genética é de extrema importância para que ocorra a evolução das espécies, possibilitando a seleção de novos genótipos com características de interesse agrônomo e industrial superiores, tais como, frutos maiores, com mais sabor e características nutracêuticas, além de apresentarem maior resistência a doenças e pragas (BRUCKNER et al., 2002).

As técnicas de melhoramentos alteram as características das plantas, principalmente o tipo, vigor, precocidade, produtividade, facilidade de enraizamento, época de colheita, resistência a doenças e pragas, resistência a calor e seca, necessidade em frio e adaptação a diversos tipos de solo. Em relação às características dos frutos são considerados importantes os aspectos como o tamanho,

cor, hábito ou formato do cacho, cicatriz, textura, firmeza, sabor, período de desenvolvimento dos frutos, conteúdo nutricional e qualidade para processamento (RASEIRA, 2004).

No Programa de Melhoramento Genético da Embrapa, as principais particularidades são: adaptação climática (baixa necessidade em frio), menor dependência de água e insumos, produtividade, época e uniformidade de maturação, tamanho dos frutos, tamanho e perceptibilidade das sementes, cor e aparência dos frutos, predominância do sabor doce, cicatriz pequena e seca (RASEIRA, 2012).

De acordo com o modo de reprodução sexuada, as espécies são classificadas em autógamas e alógamas. As autógamas são aquelas nas quais as plantas se reproduzem por autofecundação. Já as espécies alógamas se reproduzem por fecundação cruzada (BRUCKNER et al., 2002).

Dentre os métodos de melhoramento genético, a seleção massal é um método considerado simples e de baixo custo quando comparado aos demais, que consiste na seleção de variedades fenotipicamente superiores, onde são colhidos e intercruzados ao acaso. Por se tratar de uma planta alógama, novos genótipos de mirtilheiro podem ser obtidos por seleção massal, método de melhoramento muito utilizado por melhoristas por apresentar vantagens como facilidade de condução e custos reduzidos (CARVALHO et al., 2003).

## **2.4 Propriedades antioxidantes**

Os antioxidantes são compostos conhecidos por prevenir muitos distúrbios e doenças metabólicas causadas por radicais livres, como distúrbios dos olhos (degeneração da retina, catarata), pele (dermatite, psoríase, envelhecimento), pulmões (alergias e asma), rins (nefrite e outras doenças renais crônicas), articulações (gota), cérebro (enxaqueca, doenças neuro degenerativas, como Alzheimer, Parkinson, epilepsia ou síndrome pré-epiléptica em crianças), sistema imunológico (inflamações crônicas e doenças auto-imunes, dentre outras) e câncer (COTON et al., 2016). Os antioxidantes obtidos por meio da dieta, tais como as vitaminas A, C e E, os flavonoides e os carotenoides são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres (BIANCHI et al., 2009).

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos que possuem um elétron desemparelhado na última camada ocupando um único orbital

atômico ou molecular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Esse conceito faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, produzidas a partir da energia recebida por um átomo de oxigênio extremamente reativo, que de alguma forma perdeu um elétron de sua camada mais externa, com meia-vida curta e quimicamente muito reativas (CHORILLI et al., 2007). As Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) incluem todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, os quais são eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons (AGARWAL et al., 2005).

O sistema de defesa antioxidante pode atuar por meio de três mecanismos na proteção do organismo humano. A geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e de Espécies Reativas ao Nitrogênio (ERN) no organismo é fisiológica e contínua, sendo fundamental em alguns processos biológicos, como na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização celular e síntese de substâncias biológicas importantes, porém em concentrações altas geram danos as células (LANDER, 1997).

O primeiro mecanismo de proteção atua como detoxificador das ERO e ERN, impedindo a sua formação, e conseqüentemente, o efeito sobre os lipídios, proteínas, e as bases nitrogenadas (Adenina, Timina, Guanina e Citosina), evitando assim, a formação de lesões e perda da integridade celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O segundo mecanismo de defesa tem a função de reparar as lesões provocadas pelas espécies reativas, sendo que este processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e reconstituição das membranas celulares (SIES, 1993). E finalmente, o terceiro mecanismo de defesa, na qual é conhecido como sistema de reparação e está constituído, basicamente, por enzimas que reparam os danos ocasionados em proteínas e no ácido desoxirribonucléico (DNA) (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Os antioxidantes reagem diretamente com os radicais livres, levando a formação de produtos menos reativos, e além disso, participam na ativação de genes que codificam proteínas envolvidas no sistema enzimático antioxidante e/ou no silenciamento de genes que podem contribuir para a ocorrência de estresse oxidativo (FONSECA, 2007). Uma forma importante de proteger o organismo humano do estresse oxidativo é a utilização de produtos antioxidantes na alimentação.

Os alimentos são considerados a melhor fonte de antioxidantes naturais, e uma alimentação rica em frutos e vegetais fornecem ao corpo os antioxidantes necessários para prevenir doenças (SILVA, 2016). Entre os antioxidantes presentes nos frutos e nos vegetais, os mais ativos e encontrados são os compostos fenólicos, principalmente os ácidos fenólicos e flavonoides (SOARES, 2002). A atividade antioxidante dos mirtilos é influenciada pelo teor em compostos fenólicos, em particular o teor de antocianinas totais presente em elevadas concentrações na película do fruto (CASTREJÓN et al., 2008).

Segundo Matos et al. (2014), esses frutos, tem atraído atenção da população devido a sua alta capacidade antioxidante, elevada concentração de antocianinas e outros compostos fenólicos, apresentando-se como um fruto desejável e nutritivo.

Contudo, seu consumo contribui em melhorias do equilíbrio redox, principalmente por meio do estímulo às defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, levando assim à diminuição dos danos oxidativos à célula (ALKHALF et al., 2018).

## **2.5 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas. Essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK, 2004).

Quimicamente, são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE, 2005). Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SHAHIDI; NACKZ, 1995).

Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, e estão presentes nos vegetais e frutos na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998).

De acordo com a classificação de Ribéreau-Gayon (1968), esses compostos apresentam três categorias: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza.

Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza, são encontrados um número reduzido, embora com maior frequência. Nesse grupo, estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Pertencem ainda a esta família os aldeídos derivados dos ácidos benzoicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina (SOARES, 2002).

Os polímeros são alguns fenólicos que não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais, esta família engloba os taninos e as ligninas. Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados geralmente em todo reino vegetal, mas às vezes podem estar localizados em uma só planta. Esse grupo, divide-se em flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzoico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (KING; YOUNG, 1999).

Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo assim muito importantes na prevenção da oxidação celular (SHAHIDI; JANITHA, 1992).

Alguns estudos mostram, que o mirtilo (*Vaccinium* spp.) possui diversos benefícios a saúde associados à presença de compostos bioativos, principalmente relacionados as antocianinas (REQUE, 2012; ANTUNES et al., 2013; GOLDMEYER et al., 2014). Esses, apresentam alto valor antioxidante, na qual apresentam propriedades de combater aos radicais livres que provocam danos celulares e conseqüentemente desencadeiam uma série de doenças crônico-degenerativas (FACHINELLO, 2008; SARAL et al., 2015).

O mirtilo também apresenta outros compostos fenólicos em sua composição, sendo assim, considerado fonte de ácido clorogênico, quercetina, catequina, resveratrol, entre outros (GIOVANELLI; BURATTI, 2008).

Entretanto, Vizzoto et al. (2013) afirmam que vários fatores podem afetar o conteúdo de seus compostos fenólicos, tais como a maturidade dos frutos, diferenças genéticas entre cultivares, condições ambientais e processamento dos frutos (PERREIRA, 2009; SOUZA et al., 2014; SKROVANKOVA et al., 2015; VIZZOTO).

## 2.6 Antocianinas

As antocianinas são conhecidas por sua cor exuberante, que pode variar entre vermelho, laranja, roxo e azul, sendo assim considerada uma fonte de pigmento natural, pois confere a cor na maioria das flores, frutos, folhas, caules e raízes de plantas, além de pertencerem a classe dos flavonoides (KERBAUY, 2012). São estruturalmente caracterizadas pela presença do esqueleto contendo 15 átomos de carbono na forma C6-C3-C6 (LÓPEZ et al., 2000).

Segundo Março et al. (2008), as antocianidinas apresentam como estrutura fundamental o cátion flavílico (2-fenilbenzopirilium) e a molécula de antocianina encontra-se ligada a açúcares, como a glicose e a galactose e, quando esses compostos são removidos, a parte restante da molécula que ainda está pigmentada é nomeada como antocianidina. Principalmente através dessa forma, encontramos a coloração nas flores e nos frutos (KERBAUY, 2012).

O termo antocianina, derivado do grego de flor e azul (anthos = flores; kianos = azul), foi criado por Marquart no ano de 1853, referindo-se aos pigmentos azuis das flores (MARÇO et al., 2008).

São encontrados 12 tipos de antocianidinas, na qual os nomes originam-se da primeira planta em que foram isoladas, tais como cianidina, pelargonidina, petunidina, delphinidina e malvinidina (KERBAUY, 2012).

A coloração das antocianidinas é influenciada pela quantidade de grupos hidroxila (OH) ou metila (CH<sub>3</sub>), em que estão presos no anel B da molécula, além do tipo, número e local onde os açúcares estão ligados (FENNEMA, 2010; KOWALCZYK et al., 2003). A maior quantidade da presença do grupo hidroxila contribui na absorção de comprimentos de onda mais longos do espectro luminoso, deixando assim passar os comprimentos de onda mais curtos na faixa do azul, tornando a coloração azulada. Já na direção contrária, o maior número de grupos metilas favorece a absorção de comprimentos de onda mais curtos, aumentando a intensidade da coloração vermelha (LÓPEZ et al., 2000; KERBAUY, 2012).

As antocianidinas podem ter alteração na sua cor devido a variação do pH, consideradas assim como indicadores de pH. Soluções ácidas tornam a coloração avermelhada, já em situações em que o pH estiver elevado, a coloração adquire tons azulados e essas mudanças são reversíveis (KERBAUY, 2012).

Além de verificar a coloração característica aos vegetais, frutos, flores e folhas, as antocianinas também apresentam propriedades que associam sua ingestão a hábitos saudáveis na alimentação (TEIXEIRA, 2008).

A ação antioxidante deve-se à alta concentração de antocianinas na casca dos frutos, sendo o principal composto fenólico do mirtilo (*Vaccinium* spp.) (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). As antocianinas, apresentam potencial antioxidante maior que a vitamina C e o betacaroteno (KOWALCZYK et.al, 2003), compostos bioativos também presentes no mirtilo. As sementes desses frutos também possuem componentes bioativos, com teor considerável de catequinas, taninos e ácido gálico. Dessa forma, esses compostos têm sido utilizados como aditivo na indústria de cosméticos, alimentos e ainda como pigmento natural.

## **2.7 Formas de consumo**

O consumo pode ocorrer de várias formas, desde *in natura* ou após passar por processamento de desidratação, congelamento ou enlatamento (GOLDMEYER et al., 2014).

Este vem aumentando devido suas características e propriedades nutracêuticas assim, promovendo a atenção dos consumidores e produtores (PAGOT; HOFFMANN, 2003). O Brasil, em relação a produção de frutos de clima temperado ainda é insuficiente para atender a demanda por parte dos consumidores. Propiciando assim, melhores possibilidades ao mercado de produção dos frutos frescos e à industrialização (CIA et al., 2007).

Assim, devem ser aproveitados da melhor maneira por produtores, empresas, atacadistas e varejistas. Existe um preço mínimo para o comércio dos frutos frescos, elevando o custo de comercialização que ocorre devido ao transporte e armazenamento dos mesmos. Se estes critérios não forem respondidos, conseqüentemente os frutos serão destinados ao mercado de congelados (SILVA, 2007).

Os frutos de mirtilo são comercializados inteiros frescos, congelados e secos, além de serem utilizados na produção de conservas, geleias, iogurtes, polpas, tortas, sorvetes, licores, sucos, e cada vez mais, concentrados líquidos ou em pó vendidos como suplementos alimentares (CHU et al., 2011). Por ser frágil e apresentar rápida perda da qualidade pós-colheita, o seu fornecimento no mercado é muito limitado,

portanto, uma das alternativas para melhorar o seu aproveitamento econômico seria a industrialização (ANTUNES, 2002; MOTA, 2006).

## **2.8 Propriedades químicas, antioxidantes e fenólicas de diferentes cultivares de mirtilheiro**

O conteúdo de compostos bioativos nos frutos dependerá de inúmeros fatores, incluindo genótipo, tamanho dos frutos, quantidade de pigmento, condições ambientais, maturação e armazenamento dos mesmos (WANG et al., 2008). No entanto, pesquisas recentes propuseram que o conteúdo de antocianinas, ácido clorogênico e quercetina estão diretamente relacionadas as diferentes cultivares de mirtilo, além das variações sazonais que os frutos apresentam (SCALZO et al. 2013), descritas nos estudos a seguir:

Segundo estudo de Kraujalytea (2015), os maiores valores de compostos fenólicos totais foram encontrados no mirtilo do pântano (2,81 mg GAE/mL), enquanto os valores para os genótipos de *Vaccinium corymbosum* variaram de 0,85 no genótipo Bluejay a 1,76 mg de GAE/mL no genótipo “no.16”. Nota-se também que os valores de fenólicos totais em genótipos recém-criados, nomeados como “no.16” apresentou 1,76 mg GAE/mL, o genótipo Freda com 1,50 mg GAE/mL e Danut com 1,50 mg GAE/mL) foram maiores do que os genótipos consolidados no mercado como o Northland, Bluegold, Nui, Putte, Northblue e Patriot.

Ainda nesse estudo, os mirtilos apresentaram maior atividade antioxidante pelo método ABTS, com teor de 20,9  $\mu\text{mol TE/g}$ , enquanto os valores de compostos fenólicos totais dos genótipos de *Vaccinium corymbosum* foram de 6,38  $\mu\text{mol TE/g}$  no genótipo Hardyblue a 14,64  $\mu\text{mol TE/g}$  no genótipo no.16. Além disso, os outros genótipos, Danut (12,0  $\mu\text{mol TE/g}$ ) e Freda (11,55  $\mu\text{mol TE/g}$ ) também apresentaram valores altos de TEAC.

De acordo com Howard (2003), a variação antioxidante através do método Oxygen Radical-Absorbing Capacity (ORAC) e no conteúdo fenólico total entre os genótipos, apresentou-se maior quando comparado aos anos de colheita, indicando assim, que o genótipo desempenha um papel mais importante do que a idade das plantas. Os principais resultados relacionados ao ano de colheita e genótipo verificaram que as condições ambientais de crescimento alteram os níveis fenólicos, antioxidantes, conteúdo de antocianinas, além do peso dos frutos, e que certos

genótipos demonstram variação na capacidade de sintetizar fenólicos por meio de diferentes condições de crescimento.

Connor et al. (2002), ao avaliarem a capacidade antioxidante e o conteúdo fenólico de cultivares de mirtilo, descobriram que estes, apresentaram maiores diferenças pelo genótipo avaliado ao invés do ano da colheita dos frutos.

Pesquisa de Wang (2012), ao analisar diversas cultivares pertencentes a grupos distintos, verificou que o maior conteúdo de antocianinas totais foi a cultivar Early May. Essa quantidade foi, aproximadamente, trinta vezes maior que a do cultivar Pink Lemonade, na qual apresentou o nível mais baixo de antocianinas totais. As cultivares de derivados híbridos tendem a apresentar níveis fenólicos mais baixos do que as cultivares do grupo rabbiteye ou northern highbush. Da mesma forma, as capacidades antioxidantes foram significativamente diferentes entre as cultivares e entre as estações do ano, Beckyblue apresentou a menor atividade antioxidante, enquanto Early May mostrou a maior capacidade antioxidante.

Contudo, pode-se dizer que as diferenças sazonais conferiram grande impacto sobre o conteúdo de antocianinas, fenólicos totais, antioxidantes, açúcares e ácidos orgânicos. Em geral, os valores de antocianinas totais foram mais altos em 2008 do que em 2009, no entanto, o inverso ocorreu nos fenólicos totais. Já os valores de antioxidantes entre os anos apresentaram poucas diferenças significativas. Entre as trinta e duas cultivares avaliadas no estudo, em dois anos, obteve-se variação média na classificação de antocianinas totais, fenólicos totais e antioxidantes (ORAC) de 3,3 (variação, 0-12), 3,4 (variação, 0-17) e 1,0 (Variação, 0-4), respectivamente, mostrando assim que os antioxidantes apresentaram maior estabilidade ao longo dos anos (WANG, 2012).

## **2.9 Efeitos benéficos na saúde humana**

A presença dos compostos fenólicos e em particular as antocianinas presentes na película do mirtilo apresentam propriedades antioxidantes e quimioprotetoras, estas benéficas para a saúde humana (SEERAM, 2008).

As antocianinas contribuem no controle glicêmico pós-prandial, através da inibição enzimática da  $\alpha$ -glucosidase, impedindo a degradação do amido, e atribuindo assim ao fruto um ótimo potencial (WANG et al., 2012). Além de conferirem atividade

antiinflamatória, antialérgica, antimicrobiana, antitrombótica, antiarterogénica e inibição da agregação plaquetária (MOURE, 2001).

Duffy et al. (2008) realizaram estudo com ratos, verificando que a suplementação da dieta com 2% de extrato de mirtilo por 8 semanas apresentou proteção contra a neurodegeneração, mediados por excitotoxicidade e estresse oxidativo.

Seeram et al. (2006) verificaram a propriedade de extratos de mirtilo em inibir a proliferação de células tumorais na cavidade oral, mama, cólon e próstata, sendo a ação dose-dependente e em diferentes níveis de potência entre os tipos de células avaliadas. Os extratos de mirtilo também estimularam a apoptose em células cancerígenas de cólon.

De acordo com estudo de Liu et al. (2019) envolvendo um modelo de lesão hepática, o extrato de mirtilo teve papel protetor relacionado ao aumento da atividade de Superóxido Dismutase (SOD), com conseqüente atenuação de danos lipídicos em hepatócitos.

Em animais diabéticos, o extrato de mirtilo, mostrou-se eficaz de aumentar a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx), assim como os níveis de glutathione reduzidas, com conseqüente diminuição de danos oxidativos às retinas desses animais (SONG et al., 2016).

Conforme o estudo de Sun et al. (2019), o extrato de mirtilo protegeu cardiomiócitos contra a apoptose através da diminuição das EROs em um modelo *in vitro* de dano induzido por doxorubicina. Esse, foi capaz de aumentar as atividades das enzimas antioxidantes superóxido desmutase e catalase, promovendo a sobrevivência de cardiomiócitos na presença de altas concentrações de noradrenalina (LOUIS et al., 2014).

Liu et al. (2015) observaram em seu estudo, que o tratamento utilizando o extrato de mirtilo rico em antocianinas nas doses de 20 e 80 mg/kg/dia mostrou-se eficaz na diminuição da pressão arterial média e da frequência cardíaca, estas aumentadas em 20 animais que receberam ciclofosfamida.

Contudo, a ingestão regular deste fruto rico em compostos fenólicos tem sido relacionada com a inibição da proliferação de células cancerígenas, prevenindo a incidência de câncer, doenças coronárias, diminuição da pressão arterial sistólica e diastólica (BASU et al., 2010), além de contribuir com a diminuição dos efeitos do envelhecimento (LI, 2012).

## **1 PROJETO DE PESQUISA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Nutrição**  
**Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos**



**Projeto de Pesquisa**

**Características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas de genótipos e cultivares comerciais de mirtilheiro (*Vaccinium spp.*)**

**Amanda Radmann Bergmann**

**Pelotas, 2020**

**Amanda Radmann Bergmann**

**Características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas de genótipos e cultivares comerciais de mirtilheiro (*Vaccinium spp.*)**

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabete Helbig

Coorientadoras: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Catia Silveira da Silva

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Doralice Lobato de Oliveira Fischer

Pelotas, 2020

## Resumo

BERGMANN, Amanda Radmann. **Características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas de genótipos e cultivares comerciais de mirtilheiro (*Vaccinium spp.*)**. 2020. 49 f. Projeto de Pesquisa (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

O mirtilo (*Vaccinium spp.*) é considerado um pequeno fruto, nativo da América do Norte, Estados Unidos e Canadá, onde é popularmente conhecida como "blueberry". Os programas de melhoramento genético de frutíferas por meio de diferentes técnicas objetivam desenvolver culturas produtivas, que gerem frutos saudáveis e com alta qualidade, sendo assim novos genótipos de mirtilheiro podem apresentar outras características relevantes a exemplo das nutracêuticas, além das avaliadas corriqueiramente nestes programas, tais como produção, tamanho e época de produção. Essa espécie é conhecida por possuir teores elevados de antioxidantes e compostos fenólicos, atribuídos principalmente pela presença de antocianinas na casca do fruto, conferindo assim efeitos preventivos e terapêuticos à saúde humana. Diante desse contexto, com este estudo tem-se como objetivo analisar e comparar as características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas dos frutos de seis genótipos selecionados (BB3, BB4, BB6, PW1, PW2 e PW5) em relação a sete cultivares comerciais (Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Climax, Delite, Powderblue e Woodard), oriundos de uma safra que abrange o período de novembro/2019 a janeiro/2020. O experimento será conduzido à campo, com plantas provenientes de uma área experimental e de um matrizeiro e em laboratório. Os frutos colhidos em estádios completo de maturação serão acondicionados em cumbucas devidamente identificadas por genótipos e, posteriormente, serão levados ao laboratório onde serão realizadas as análises. Os frutos destinados as análises de cor, sólidos solúveis, pH, acidez titulável e antocianinas totais serão pesados e separados por repetição de 100 g (R1, R2 e R3) e armazenados em sacos plásticos com fecho zíper, posteriormente congelados e mantidos em freezer com temperatura de -20° C. A outra parte dos frutos passará pelo mesmo procedimento anterior e será composto por amostras com repetições de 200 g, onde serão armazenados em ultrafreezer com temperatura de -80° C até passarem pelo processo de liofilização, e posteriormente acondicionadas em tubos Falcon com capacidade de 45 mL e mantidos em congelamento até a realização das análises de antioxidantes, compostos fenólicos totais e antocianinas individuais. As análises serão realizadas a partir de 13 amostras, que terão 3 repetições em cada amostra, totalizando 39 amostras x 9 determinações (protocolos) = 351 determinações x 3 repetições = 1.053 determinações. Portanto, este estudo será realizado visando caracterizar seis genótipos já selecionados e dentre estes, identificar os que apresentam possíveis características funcionais superiores quando comparados aos seus genitores e possíveis genitores.

Palavras-chave: Alimentos funcionais. Antocianinas. Características nutracêuticas. Genitores. Pequenos frutos. *Vaccinium ashei* Reade.

## Abstract

BERGMANN, Amanda Radmann. **Physico-chemical, antioxidant and phenolic characteristics of blueberry genotypes and commercial cultivars (*Vaccinium spp.*)**. 2020. 49 f. Research Project (Master in Nutrition and Food) - Graduate Program in Nutrition and Food, Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Blueberry (*Vaccinium spp.*) is considered a small fruit, native to North America, the United States and Canada, where it is popularly known as "blueberry." The fruit breeding programs using different techniques aim to develop productive crops, which generate healthy and high-quality fruits, so new blueberry genotypes may have other relevant characteristics such as nutraceuticals, in addition to those commonly evaluated in these programs, such as production, size and time of production. This species is known to have high levels of antioxidants and phenolic compounds, mainly attributed to the presence of anthocyanins in the fruit peel, thus giving preventive and therapeutic effects to human health. In this context, this study aims to analyze and compare the physical-chemical, antioxidant and phenolic characteristics of the fruits of six genotypes selected (BB3, BB4, BB6, PW1, PW2 and PW5) in relation to seven commercial cultivars (Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Climax, Delite, Powderblue and Woodard), coming from a harvest that covers the period from November / 2019 to January/2020. The experiment will be conducted in the field, with plants from an experimental area and a matrix maker and in the laboratory. The fruits harvested in full maturity stages will be packed in bowls duly identified by genotypes and will later be taken to the laboratory where the analyzes will be carried out. The fruits for color analysis, soluble solids, pH/acidity and total anthocyanins will be weighed and separated by repetition of 100 g (R1, R2 and R3) and stored in plastic bags with zipper closure, later frozen and kept in a freezer with a temperature of  $-20^{\circ}$  C. The other part of the fruit will go through the same procedure as above and will be composed of samples with 200 g repetitions, where they will be stored in an ultrafreezer with a temperature of  $-80^{\circ}$  C until they pass through the freeze-drying process, and then conditioned in Falcon tubes with a capacity of 45 mL and kept in freezing until the analysis of antioxidants, total phenolic compounds and individual anthocyanins. The analyzes will be performed from 13 samples, which will have 3 repetitions in each sample, totaling 39 samples x 9 determinations (protocols) = 351 determinations x 3 repetitions = 1.053 determinations. Therefore, this work will be carried out aiming to characterize six genotypes already selected and, among these, to identify those that present possible superior functional characteristics when compared to their parents and possible parents.

Keywords: Functional foods. Anthocyanins. Nutraceutical characteristics. Parents. Small fruits. *Vaccinium ashei* Reade.

### Lista de Tabelas

Tabela 1	Características físico-químicas e fenologia das cultivares.....	39
Tabela 2	Número de amostras e variáveis do estudo.....	55
Tabela 3	Programa do gradiente de eluição dos solventes para separação de antocianinas em mirtilo ( <i>Vaccinium</i> spp.).....	60
Tabela 4	Atividades que serão realizadas durante o período da Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos.....	63
Tabela 5	Materiais e insumos necessários para a execução do projeto de pesquisa.....	64

## 1 INTRODUÇÃO

O mirtilheiro (*Vaccinium* spp.) é uma espécie frutífera, cujo fruto mirtilo é considerado um pequeno fruto nativo da América do Norte e Europa, onde é conhecido popularmente como “*blueberry*” é muito apreciado por seu sabor exótico e por apresentar propriedades funcionais (ENGLAND, 2015; KANG et al., 2015; CARDEÑOSA et al., 2016; LI et al., 2016).

De acordo com Retamales et al. (2015), a produção mundial desse fruto aumentou consideravelmente, principalmente entre o período de 1998 a 2011, de 143.704 para 467.048 toneladas. Já na América do Sul, especificamente no Peru, pode-se observar um aumento de 40,4% na área cultivada de mirtilo, aumento de 20,4% na produção, além do acréscimo de 82,8% na produtividade do fruto no período de 2015 a 2018 (FAOSTAT, 2019).

No Brasil, seu cultivo ainda é recente e por isso é pouco conhecida, porém as pesquisas têm se intensificado cada vez mais, com o intuito de verificar a adaptabilidade às condições climáticas do país (RASEIRA; ANTUNES, 2004).

Atualmente, diversos programas de melhoramento genético do mirtilheiro, estão em busca da ampliação de zonas de adaptação de diferentes cultivares que possam contribuir para melhorar produtividade e qualidade dos frutos aos consumidores (BRUCKNER et al.; 2002; PAGANINI, 2009).

Dentre as técnicas utilizadas, a seleção massal é um método de melhoramento genético que consiste na seleção de variedades fenotipicamente superiores, onde são colhidos e intercruzados ao acaso, e é o protocolo mais utilizado por melhoristas para a seleção de novos genótipos de mirtilheiro (CARVALHO et al., 2003).

Diversos estudos relacionados ao consumo do mirtilo, conferem inúmeros benefícios à saúde humana, devido à grande variedade de polifenóis, principalmente às antocianinas encontradas na casca e das propriedades antioxidantes, superiores em relação à maioria dos frutos (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; WOLFE et al., 2008).

Atuando assim, na prevenção e tratamento de certas patologias, como doenças cardiovasculares, apoptose de células cancerígenas, ação anti-inflamatória, melhora a circulação sanguínea, assim como patologias relacionadas à visão, edemas, artrites, artroses, além de contribuir na prevenção do envelhecimento (CANTUARIAS-AVILES et al., 2014).

Diante desse contexto, este estudo será realizado com o objetivo de analisar e comparar as características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas dos frutos de seis genótipos selecionados (BB3, BB4, BB6, PW1, PW2 e PW5) em relação a sete cultivares comerciais (Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Climax, Delite, Powderblue e Woodard) de mirtilheiro, provenientes do ciclo de produção de 2019/20.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O embasamento teórico para o presente estudo foi realizado a partir da busca em idiomas português, inglês e espanhol nas seguintes massas de dados: Google Acadêmico, Periódicos Capes e Scielo. Foram utilizados 64 artigos científicos, 14 livros, 1 tese, 3 dissertações e 4 folhetos que apresentam relevância e que agregaram na estruturação do projeto de pesquisa.

Não houve restrições em relação ao ano de publicação dos periódicos, pois certos temas relevantes abordados com intuito de maiores entendimentos sobre os assuntos constam somente em publicações mais antigas.

A seleção foi realizada com massa na leitura de títulos e resumos considerados relevantes. Por último, os artigos foram selecionados a partir de uma leitura integral dos mesmos. Os critérios de exclusão adotados nas buscas foram os estudos que não contemplavam temas propostos no embasamento teórico.

### 2.1 Pequenos frutos e mirtilo (*Vaccinium spp.*)

O conceito “pequenos frutos” ou “berries”, é utilizado na literatura internacional quando se refere à várias culturas, como exemplo a do morangueiro, amoreira preta, framboeseira, groselheira, mirtilheiro, entre outras (ANTUNES, 2002).

A produtividade desses frutos nativos de clima temperado por área é alta, as exportações têm crescido nos últimos anos, assim como a área plantada e em muitas regiões é considerada uma importante alternativa, tanto para os pequenos produtores como para as grandes empresas (PAYNE, 2005).

A demanda por esses frutos tem aumentado muito nos últimos anos, pois são ricos em propriedades benéficas ao organismo humano, apresentando elevados teores de substâncias antioxidantes e anticancerígenas, atraindo assim o consumidor e o produtor. Dentre essas frutíferas, o mirtilo é classificado como o fruto que possui a maior quantidade de antioxidantes já estudada, pois contém um elevado teor de polifenóis tanto na casca quanto na polpa. Sua disponibilidade e versatilidade permitem que seja incorporada em uma ampla variedade de formulações (PAYNE, 2005).

O mirtilo pertence à família Ericaceae, subfamília Vaccinoideae e gênero *Vaccinium*. É nativo da América do Norte, Estados Unidos e Canadá, onde é denominado "blueberry" (RASEIRA, 2004).

No Brasil, o cultivo é ainda recente e pouco conhecido. As primeiras plantas da cultura foram trazidas em 1983 pela Embrapa Clima Temperado de Pelotas (RS), com a introdução da coleção de cultivares de baixa exigência em frio do grupo “Rabbiteye”, oriundas da Universidade da Flórida. A região de Vacaria (RS), em 1990 foi pioneira na produção comercial e é a grande referência em termos de produção (HOFFMANN, 2004; RASEIRA, 2006; SILVA et al., 2008).

A área cultivada no Brasil ultrapassa 150 hectares, sendo praticamente toda a produção destinada à exportação. O Rio Grande do Sul (RS) é o estado que mais se destaca na produção, com 45 produtores em uma área de 65 ha, produzem um total de 150 toneladas (FACHINELLO, 2008).

As plantas apresentam porte arbustivo, com hábito de crescimento basitônico, ou seja, as brotações que dão origem as hastes principais ocorrem, preferencialmente, nas gemas basais. Fator este, que define o porte da planta (RASEIRA, 2004).

Dentre os cinco grupos mais importantes (highbush, half high, southern highbush, rabbiteye e lowbush) dois se destacam, rabbiteye e highbush. As cultivares do primeiro grupo adaptam-se em regiões de pouco frio (cerca de 300 horas de frio), enquanto as do segundo em regiões mais frias, que geralmente coincidem com as de maior altitude. No Brasil, as principais cultivares implantadas pertencem ao grupo rabbiteye, devido à baixa necessidade em horas de frio. As plantas desse grupo podem alcançar de dois a quatro metros de altura e apresentam as seguintes características: vigor, longevidade, produtividade, tolerância ao calor e à seca, variações de solo, baixa necessidade de frio, produzindo assim frutos mais ácidos quando comparadas ao do grupo highbush, que são firmes e de longa conservação (RASEIRA, 2004).

Entre as limitações das cultivares do grupo rabbiteye, destaca-se a completa coloração do fruto antes do ponto ideal da colheita, onde estaria com melhor qualidade em relação ao sabor, a tendência de rachar a película em períodos úmidos e o longo período até alcançar o máximo de produtividade (ANTUNES et al., 2008).

O mirtilo é um fruto não climatérico, ou seja, a velocidade respiratória diminui gradativamente da colheita à senescência. Como os frutos não amadurecem após serem colhidas, deve-se realizar a colheita no estágio ideal de maturação para o consumo (SOUSA et al., 2007).

Seus frutos são de cor azul intensa, recobertas de cera (pruína), baciforme e globulosa, sumarenta e apresentam um sabor agridoce, com diâmetro que varia entre 1,5 a 2,5 cm, além de conter diversas sementes de tamanho pequeno (HOFFMANN; ANTUNES, 2004). Possui cicatriz localizada diametralmente oposta ao ápice, de dimensão e formato variáveis, conforme a espécie e a cultivar (SOUZA et al., 2007).

## 2.2 Características físico-químicas dos frutos e fenologia das cultivares

A caracterização físico-química dos frutos e a fenologia de floração e maturação provenientes de sete cultivares foi realizada na Embrapa Clima Temperado, por Raseira (2004) e Antunes et al. (2008), conforme descrição abaixo.

**Bluebelle:** originária da Geórgia, é auto fértil, mede de 1,0 a 1,7 cm de diâmetro. Apresenta frutos firmes, de tamanho pequeno a médio, com peso médio de 2,2 g. O sabor é doce e ácido, predominando a acidez. A película é escura com presença moderada de pruína. O teor médio de sólidos solúveis é de 11,5° Brix. O início da floração ocorre de 15 a 25 de agosto e a maturação entre 3 a 14 de dezembro, finalizando de 20 a 31 de janeiro.

**Bluegem:** é uma cultivar originária da Flórida. Proveniente de polinização livre, necessita de polinização cruzada, sendo Woodard uma das polinizadoras recomendadas. Os frutos são de tamanho médio, contém muita pruína e são muito saborosas, com diâmetro de 1,0 e 1,6 cm e peso médio em torno de 1,3 g. O teor de sólidos solúveis varia entre 10,5 a 12,6° Brix. Inicia o florescimento entre 10 a 25 de agosto e a maturação dos frutos entre 8 a 14 de dezembro, finalizando de 20 a 26 de janeiro.

**Briteblue:** oriunda da Geórgia, seus frutos medem acima de 1,3 cm de diâmetro, apresentam tamanho grande, com película azul clara, boa firmeza e sabor regular. O peso e o diâmetro dos frutos variam de 1,3 a 1,6 g e 1,0 a 1,7 cm, respectivamente apresentando teor de sólidos solúveis entre 9,2 e 11,3° Brix. O início da floração varia entre 10 a 25 de agosto e a colheita ocorre de 9 a 14 de dezembro, finalizando de 20 a 26 de janeiro.

**Climax:** também originária da Geórgia, é proveniente de um cruzamento entre 'Callaway' e 'Ethel'. Os frutos apresentam tamanho médio, com película azul escura e sabor doce e ácido. O diâmetro dos frutos varia de 1 a 1,5 cm com peso médio de 1,8 g, a película apresenta muita pruína, dando ao fruto um aspecto bem azulado. O teor de sólidos solúveis varia entre 10 e 12,4° Brix. O início da floração ocorre entre 10 a

25 de agosto e o início da maturação no início da primeira quinzena de dezembro, finalizando de 7 a 26 de janeiro.

**Delite:** originária da Geórgia, é oriunda do cruzamento de duas seleções: T14 e T15. Os frutos são excelentes, geralmente de tamanho pequeno a médio, variando entre 1,2 e 1,8 cm de diâmetro com peso médio dos frutos de 1,2 g. A película apresenta menos pruína do que os frutos da cv. Climax, sendo bem escura. O teor de sólidos solúveis varia entre 10,8 a 12,5° Brix. A floração ocorre de 10 a 25 de agosto e o amadurecimento dos frutos de 14 a 20 de dezembro, finalizando de 7 a 31 de janeiro.

**Powderblue:** originária de Maryland, os frutos são de tamanho médio, com diâmetro entre 1,2 a 1,5 cm e peso médio dos frutos de 1, 2 g. Apresentam sabor ótimo, caracterizado como doce e ácido equilibrado. É uma das cultivares que apresentam maior quantidade de pruína e possui película azul clara. As plantas são resistentes a doenças, muito produtivas e vigorosas. O teor de sólidos solúveis varia entre 11 a 11,7° Brix. A floração ocorre de 10 a 30 de agosto e a colheita dos frutos varia entre 14 a 22 de dezembro, podendo finalizar de 20 a 31 de janeiro.

**Woodard:** cultivar originária da Geórgia, oriunda do cruzamento entre 'Ethel' e 'Callaway'. Os frutos são de tamanho grande com a película azul clara. Apresentam pouca firmeza, portanto, inadequados para serem transportados a longas distâncias. O diâmetro varia de 1,1 a 1,5 cm, com peso médio entre 1,0 a 1,2 g. Apresentam teor de sólidos solúveis superior a 12° Brix, podendo alcançar até 13,9° Brix. O período de floração desta cultivar tem início no dia 10 de agosto e pode estender até o dia 28 de agosto, já a maturação inicia de 9 a 14 de dezembro, finalizado entre 20 a 26 de janeiro.

Tabela 1 – Características físico-químicas e fenologia das cultivares de mirtilo (*Vaccinium spp.*) conforme dados da revisão bibliográfica.

<b>Cultivares</b>	<b>Origem</b>	<b>Diâmetro</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Peso</b>	<b>Sabor</b>	<b>Pruína</b>	<b>Película</b>	<b>SS</b>	<b>Floração</b>	<b>Maturação</b>
<b><u>Bluebelle</u></b>	Geórgia	1,0 a 1,7 cm	Pequeno a médio	2,2 g	Doce e ácido	Moderada	Azul escura	11,5° Brix	15 a 25/ago	3/dez a 31/jan
<b><u>Bluegem</u></b>	Flórida	1,0 e 1,6 cm	Médio	1,3 g	Muito saborosos	Muita	--	10,5 a 12,6° Brix	10 a 25/ago.	8/dez a 26/jan
<b><u>Briteblue</u></b>	Geórgia	1,0 a 1,7 cm	Grande	1,3 a 1,6 g	Regular	--	Azul clara	9,2 a 11,3° Brix	10 a 25/ago	9/dez a 26/jan
<b><u>Climax</u></b>	Geórgia	1,0 a 1,5 cm	Médio	1,8 g	Doce e ácido	Muita	Azul escura	10 e 12,4° Brix	10 a 25/ago	Primeira quinzena de dez. a 26/jan
<b><u>Delite</u></b>	Geórgia	1,2 e 1,8 cm	Pequeno a médio	1,2 g	Excelente	Moderada	Azul escura	10,8 e 12,5° Brix	10 a 25/ago	14/dez a 31/jan
<b><u>Powderblue</u></b>	Maryland	1,2 a 1,5 cm	Médio a bom	1,2 g	Doce e ácido equilibrado	Muita	Azul clara	11 a 11,7°Brix	10 a 30/ago	14/dez a 31/jan

<b>Woodard</b>	Geórgia	1,1 a 1,5 cm	Grande	1,0 a 1,2 g	--	--	Azul clara	12 a 13,9° Brix	10 a 28/ago	9/dez a 26/jan
----------------	---------	-----------------	--------	----------------	----	----	------------	--------------------	----------------	-------------------

Fonte: elaboração do autor a partir das referências apresentadas no texto acima.

### 2.3 Melhoramento genético da espécie

O melhoramento genético de frutíferas é uma área de extrema importância que está crescendo muito no Brasil por proporcionar o desenvolvimento de culturas altamente produtivas que geram frutos saudáveis e com alta qualidade, além de promover o mínimo possível de agressão ao meio ambiente.

Esses programas têm como objetivo principal desenvolver tanto cultivares-copa quanto porta-enxertos que possam contribuir para melhorar a produtividade, a qualidade e a maior oferta de frutos, atendendo assim as necessidades da cadeia produtiva, na qual engloba a produção, transporte, comércio, indústria e consumidores.

A variabilidade genética é de extrema importância para que ocorra a evolução das espécies, possibilitando a seleção de novos genótipos com características de interesse agrônomo superiores, tais como, frutos maiores, com mais sabor e características nutracêuticas, além de apresentarem maior resistência a doenças e pragas (BRUCKNER et al., 2002).

As técnicas de melhoramentos alteram as características das plantas, principalmente o tipo, vigor, precocidade, produtividade, facilidade de enraizamento, época de colheita, resistência a doenças e pragas, resistência a calor e seca, necessidade em frio e adaptação a diversos tipos de solo. Em relação às características dos frutos são considerados importantes os aspectos como o tamanho, cor, hábito ou formato do cacho, cicatriz, textura, firmeza, sabor, período de desenvolvimento dos frutos, conteúdo nutricional e qualidade para processamento (RASEIRA, 2004).

No Programa de Melhoramento Genético da Embrapa, as principais particularidades são: adaptação climática (baixa necessidade em frio), menor dependência de água e insumos, produtividade, época e uniformidade de maturação, tamanho dos frutos, tamanho e perceptibilidade das sementes, cor e aparência dos frutos, predominância do sabor doce, cicatriz pequena e seca (RASEIRA, 2012).

De acordo com o modo de reprodução sexuada, as espécies são classificadas em autógamas e alógamas. As autógamas são aquelas nas quais as plantas se reproduzem por autofecundação. Já as espécies alógamas se reproduzem por fecundação cruzada (BRUCKNER et al., 2002).

Dentre os métodos de melhoramento genético, a seleção massal é um método considerado simples e de baixo custo quando comparado aos demais, que consiste na seleção de variedades fenotipicamente superiores, onde são colhidos e intercruzados ao acaso. Por se tratar de uma planta alógama, novos genótipos de mirtilheiro podem ser obtidos por seleção massal, método de melhoramento muito utilizado por melhoristas por apresentar vantagens como facilidade de condução e custos reduzidos (CARVALHO et al., 2003).

## **2.4 Propriedades antioxidantes**

Os antioxidantes são compostos conhecidos por prevenir muitos distúrbios e doenças metabólicas causadas por radicais livres, como distúrbios dos olhos (degeneração da retina, catarata), pele (dermatite, psoríase, envelhecimento), pulmões (alergias e asma), rins (nefrite e outras doenças renais crônicas), articulações (gota), cérebro (enxaqueca, doenças neuro degenerativas, como Alzheimer, Parkinson, epilepsia ou síndrome pré-epiléptica em crianças), sistema imunológico (inflamações crônicas e doenças auto-imunes, dentre outras) e câncer (COTON et al., 2016). Os antioxidantes obtidos por meio da dieta, tais como as vitaminas A, C e E, os flavonóides e os carotenóides são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres (BIANCHI et al., 2009).

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos que possuem um elétron desemparelhado na última camada ocupando um único orbital atômico ou molecular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Esse conceito faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, produzidas a partir da energia recebida por um átomo de oxigênio extremamente reativo, que de alguma forma perdeu um elétron de sua camada mais externa, com meia-vida curta e quimicamente muito reativas (CHORILLI et al., 2007). As Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) incluem todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, os quais são eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons (AGARWAL et al., 2005).

O sistema de defesa antioxidante pode atuar por meio de três mecanismos na proteção do organismo humano. A geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

e de Espécies Reativas ao Nitrogênio (ERN) no organismo é fisiológica e contínua, sendo fundamental em alguns processos biológicos, como na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização celular e síntese de substâncias biológicas importantes, porém em concentrações altas geram danos as células (LANDER, 1997).

O primeiro mecanismo de proteção atua como detoxificador das ERO e ERN, impedindo a sua formação, e conseqüentemente, o efeito sobre os lipídios, proteínas, e as massas do DNA (Adenina, Timina, Guanina e Citosina), evitando assim, a formação de lesões e perda da integridade celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O segundo mecanismo de defesa tem a função de reparar as lesões provocadas pelas espécies reativas, sendo que este processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e reconstituição das membranas celulares (SIES, 1993). E finalmente, o terceiro mecanismo de defesa, na qual é conhecido como sistema de reparação e está constituído, basicamente, por enzimas que reparam os danos ocasionados em proteínas e no ácido desoxirribonucléico (ADN) (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Os antioxidantes reagem diretamente com os radicais livres, levando a formação de produtos menos reativos, e além disso, participam na ativação de genes que codificam proteínas envolvidas no sistema enzimático antioxidante e/ou no silenciamento de genes que podem contribuir para a ocorrência de estresse oxidativo (FONSECA, 2007). Uma forma importante de proteger o organismo humano do estresse oxidativo é a utilização de produtos antioxidantes na alimentação.

Os alimentos são considerados a melhor fonte de antioxidantes naturais, e uma alimentação rica em frutos, vegetais e grãos fornece ao corpo os antioxidantes necessários para prevenir doenças (SILVA, 2016). Entre os antioxidantes presentes nos frutos e nos vegetais, os mais ativos e encontrados são os compostos fenólicos, principalmente os ácidos fenólicos e flavonóides (SOARES, 2002). A atividade antioxidante dos mirtilos é influenciada pelo teor em compostos fenólicos, em particular o teor de antocianinas totais presente em elevadas concentrações na película do fruto (CASTREJÓN et al., 2008).

Segundo Matos et al. (2014), o mirtilo, tem atraído atenção da população devido a sua alta capacidade antioxidante, elevada concentração de antocianinas e outros compostos fenólicos, apresentando-se como um fruto desejável e nutritivo.

Contudo, o consumo desse fruto contribui em melhorias do equilíbrio redox, principalmente por meio do estímulo às defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, levando assim à diminuição dos danos oxidativos à célula (ALKHALF et al., 2018).

## 2.5 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas. Essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK, 2004).

Quimicamente, são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE, 2005). Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SHAHIDI; NACKZ, 1995).

Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, e estão presentes nos vegetais e frutos na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998).

De acordo com a classificação de Ribéreau-Gayon (1968), esses compostos apresentam três categorias: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza.

Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza, são encontrados um número bem reduzido, embora com maior frequência. Nesse grupo, estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Pertencem ainda a esta família os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina (SOARES, 2002).

Os polímeros são alguns fenólicos que não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais, esta família engloba os taninos e as ligninas. Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados geralmente em todo reino vegetal, mas às vezes podem estar localizados em uma só planta. Esse grupo, divide-se em flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (KING; YOUNG, 1999).

Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo assim muito importantes na prevenção da oxidação celular (SHAHIDI; JANITHA, 1992).

Alguns estudos mostram, que o mirtilo (*Vaccinum* spp.) possui diversos benefícios a saúde associados à presença de compostos bioativos, principalmente relacionados as antocianinas (REQUE, 2012; ANTUNES et al., 2013; GOLDMEYER et al., 2014). Estes, apresentam alto valor antioxidante, na qual apresentam propriedades de combater aos radicais livres que provocam danos celulares e conseqüentemente desencadeiam uma série de doenças crônico-degenerativas (FACHINELLO, 2008; SARAL et al., 2015).

O mirtilo também apresenta outros compostos fenólicos em sua composição, sendo assim também considerado fonte de ácido clorogênico, quercitina, catequina, resveratrol, entre outros (GIOVANELLI; BURATTI, 2008).

Entretanto, Vizzoto et al. (2013) afirmam que vários fatores podem afetar o conteúdo de compostos fenólicos em mirtilos, como a maturidade dos frutos, diferenças genéticas entre cultivares, condições ambientais e processamento dos frutos (PERREIRA, 2009; SOUZA et al., 2014; SKROVANKOVA et al., 2015; VIZZOTO).

## **2.6 Antocianinas**

As antocianinas são conhecidas por sua cor exuberante, que pode variar entre vermelho, laranja, roxo e azul, sendo assim considerada uma fonte de pigmento natural, pois confere a cor na maioria das flores, frutos, folhas, caules e raízes de plantas, além de pertencerem a classe dos flavonoides (KERBAUY, 2012). São estruturalmente caracterizadas pela presença do esqueleto contendo 15 átomos de carbono na forma C6-C3-C6 (LÓPEZ et al., 2000).

Segundo Março et al. (2008), as antocianidinas apresentam como estrutura fundamental o cátion flavílico (2-fenilbenzopirillium) e a molécula de antocianina encontra-se ligada a açúcares, como a glicose e a galactose e, quando esses compostos são removidos, a parte restante da molécula que ainda está pigmentada é nomeada como antocianidina. Principalmente através dessa forma, encontramos a coloração nas flores e nos frutos (KERBAUY, 2012).

O termo antocianina, derivado do grego de flor e azul (anthos = flores; kianos = azul), foi criado por Marquart no ano de 1853, referindo-se aos pigmentos azuis das flores (MARÇO et al., 2008).

São encontrados doze tipos de antocianidinas, na qual os nomes originam-se da primeira planta em que foram isoladas, tais como cianidina, pelargonidina, petunidina, delphinidina e malvinidina (KERBAUY, 2012).

A coloração das antocianidinas é influenciada pela quantidade de grupos hidroxila (OH) ou metila (CH<sub>3</sub>), em que estão presos no anel B da molécula, além do tipo, número e local onde os açúcares estão ligados (FENNEMA, 2010; KOWALCZYK et al., 2003). A maior quantidade da presença do grupo hidroxila contribui na absorção de comprimentos de onda mais longos do espectro luminoso, deixando assim passar os comprimentos de onda mais curtos na faixa do azul, tornando a coloração azulada. Já na direção contrária, o maior número de grupos metilas favorece a absorção de comprimentos de onda mais curtos, aumentando a intensidade da coloração vermelha (LÓPEZ et al., 2000; KERBAUY, 2012).

As antocianidinas podem ter alteração na sua cor devido a variação do pH, consideradas assim como indicadoras de pH. Soluções ácidas tornam a coloração avermelhada, já em situações em que o pH estiver elevado, a coloração adquire tons azulados e essas mudanças são reversíveis (KERBAUY, 2012).

Além de verificar a coloração característica aos vegetais, frutos, flores e folhas, as antocianinas também apresentam propriedades que associam sua ingestão a hábitos saudáveis na alimentação (TEIXEIRA, 2008).

A ação antioxidante deve-se à alta concentração de antocianinas na casca dos frutos, sendo o principal composto fenólico do mirtilo (*Vaccinium* spp.) (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). As antocianinas, apresentam potencial antioxidante maior que a vitamina C e o betacaroteno (KOWALCZYK et al., 2003), compostos bioativos também presentes no mirtilo. A semente desse fruto também possui componentes bioativos, com teor considerável de catequinas, taninos e ácido gálico. Dessa forma, esses compostos têm sido utilizados como aditivo na indústria de cosméticos, alimentos e ainda como pigmento natural.

## 2.7 Formas de consumo

O consumo do mirtilo pode ocorrer de várias formas, desde *in natura* ou após passar por processamento de desidratação, congelamento ou enlatamento (GOLDMEYER et al., 2014).

Este, vem aumentando devido suas características e propriedades nutraceuticas assim, promovendo a atenção dos consumidores e produtores (PAGOT; HOFFMANN, 2003). O Brasil, em relação a produção de frutos de clima temperado ainda é insuficiente para atender a demanda por parte dos consumidores. Propiciando assim, melhores possibilidades ao mercado de produção dos frutos frescos e à industrialização (CIA et al., 2007).

Assim, devem ser aproveitados da melhor maneira por produtores, empresas, atacadistas e varejistas. Existe um preço mínimo para o comércio dos frutos frescos, elevando o custo de comercialização que ocorre devido ao transporte e armazenamento dos mesmos. Se estes critérios não forem respondidos, conseqüentemente os frutos serão destinados ao mercado de congelados (SILVA, 2007).

Os frutos de mirtilo, são comercializados inteiros frescos, congelados e secos, além de serem utilizados na produção de conservas, geleias, iogurtes, polpas, tortas, sorvetes, licores, sucos, e cada vez mais, concentrados líquidos ou em pó vendidos como suplementos alimentares (CHU et al., 2011). Por ser frágil e apresentar rápida perda da qualidade pós-colheita, o seu fornecimento no mercado é muito limitado, portanto, uma das alternativas para melhorar o seu aproveitamento econômico seria a industrialização (ANTUNES, 2002; MOTA, 2006).

## 2.8 Propriedades químicas, antioxidantes e fenólicas de diferentes cultivares de mirtilheiro

O conteúdo de compostos bioativos nos frutos dependerá de inúmeros fatores, incluindo genótipo, tamanho dos frutos, quantidade de pigmento, condições ambientais, maturação e armazenamento dos mesmos (WANG et al., 2008). No entanto, pesquisas recentes propuseram que o conteúdo de antocianinas, ácido clorogênico e quercetina estão diretamente relacionadas as diferentes cultivares de mirtilo, além das variações sazonais que os frutos apresentam (SCALZO et al. 2013), descritas nos estudos a seguir:

Segundo estudo de Kraujalytea (2015), os maiores valores de compostos fenólicos totais foram encontrados no mirtilo do pântano (2,81 mg GAE/mL), enquanto os valores para os genótipos de *Vaccinium corymbosum* variaram de 0,85 no genótipo Bluejay a 1,76 mg de GAE/mL no genótipo “no.16”. Nota-se também que os valores de fenólicos totais em genótipos recém-criados, nomeados como no.16 apresentou 1,76 mg GAE/mL, o genótipo Freda com 1,50 mg GAE/mL e Danut com 1,50 mg GAE/mL) foram maiores do que os genótipos consolidados no mercado como o Northland, Bluegold, Nui, Putte, Northblue e Patriot.

Ainda nesse estudo, os mirtilos apresentaram maior atividade antioxidante pelo método ABTS, com teor de 20,9  $\mu\text{mol TE/g}$ , enquanto os valores de TEAC dos genótipos de *Vaccinium corymbosum* foram de 6,38  $\mu\text{mol TE/g}$  no genótipo Hardyblue a 14,64  $\mu\text{mol TE/g}$  no genótipo no.16. Além disso, os outros genótipos, Danut (12,0  $\mu\text{mol TE/g}$ ) e Freda (11,55  $\mu\text{mol TE/g}$ ) também apresentaram valores altos de TEAC.

De acordo com Howard (2003), a variação antioxidante através do método Oxygen Radical-Absorbing Capacity (ORAC) e no conteúdo fenólico total entre os genótipos, apresentou-se maior quando comparado aos anos de colheita, indicando assim, que o genótipo desempenha um papel mais importante do que a idade das plantas. Os principais resultados relacionados ao ano de colheita e genótipo verificaram que as condições ambientais de crescimento alteram os níveis fenólicos, antioxidantes, conteúdo de antocianinas, além do peso dos frutos, e que certos genótipos demonstram variação na capacidade de sintetizar fenólicos por meio de diferentes condições de crescimento.

Connor et al. (2002), ao avaliarem a capacidade antioxidante e o conteúdo fenólico de cultivares de mirtilo, descobriram que estes, apresentaram maiores diferenças pelo genótipo avaliado ao invés do ano da colheita dos frutos.

Pesquisa de Wang (2012), ao analisar diversas cultivares pertencentes a grupos distintos, verificou que o maior conteúdo de antocianinas totais foi a cultivar Early May. Essa quantidade foi aproximadamente trinta vezes maior que a do cultivar Pink Lemonade, na qual apresentou o nível mais baixo de antocianinas totais. As cultivares de derivados híbridos tendem a apresentar níveis fenólicos mais baixos do que as cultivares do grupo rabbiteye ou northern highbush. Da mesma forma, as capacidades antioxidantes foram significativamente diferentes entre as cultivares e entre as estações do ano, Beckyblue apresentou a menor atividade antioxidante, enquanto Early May verificou a maior capacidade antioxidante.

Contudo, pode-se dizer que as diferenças sazonais conferiram grande impacto sobre o conteúdo de antocianinas, fenólicos antioxidantes, açúcares e ácidos orgânicos. Em geral, os valores de antocianinas totais foram mais altos em 2008 do que em 2009, no entanto, o inverso ocorreu nos fenólicos totais. Já os valores de antioxidantes entre os anos apresentaram poucas diferenças significativas. Entre as trinta e duas cultivares avaliadas no estudo, em dois anos, obteve-se variação média na classificação de antocianinas totais, fenólicos totais e antioxidantes (ORAC) de 3,3 (variação, 0-12), 3,4 (variação, 0-17) e 1,0 (Variação, 0-4), respectivamente, mostrando assim que os antioxidantes apresentaram maior estabilidade ao longo dos anos (WANG, 2012).

## **2.9 Efeitos benéficos na saúde humana**

A presença dos compostos fenólicos e em particular as antocianinas presentes na película do mirtilo apresentam propriedades antioxidantes e quimioprotetoras, estas benéficas para a saúde humana (SEERAM, 2008).

As antocianinas contribuem no controle glicêmico pós-prandial, através da inibição enzimática da  $\alpha$ -glucosidase, impedindo a degradação do amido, e atribuindo assim ao fruto um ótimo potencial (WANG et al., 2012). Além de conferirem atividade antiinflamatória, antialérgica, antimicrobiana, antitrombótica, antiarterogénica e inibição da agregação plaquetária (MOURE, 2001).

Duffy et al. (2008) realizaram estudo com ratos, verificando que a suplementação da dieta com 2% de extrato de mirtilo por 8 semanas apresentou proteção contra a neurodegeneração, mediados por excitotoxicidade e estresse oxidativo.

Seeram et al. (2006) verificaram a propriedade de extratos de mirtilo em inibir a proliferação de células tumorais na cavidade oral, mama, cólon e próstata, sendo a ação dose-dependente e em diferentes níveis de potência entre os tipos de células avaliadas. Os extratos de mirtilo também estimularam a apoptose em células cancerígenas de cólon.

De acordo com estudo de Liu et al. (2019) envolvendo um modelo de lesão hepática, o extrato de mirtilo teve papel protetor relacionado ao aumento da atividade de Superóxido Dismutase (SOD), com conseqüente atenuação de danos lipídicos em hepatócitos.

Em animais diabéticos, o extrato de mirtilo, mostrou-se eficaz de aumentar a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx), assim como os níveis de glutathionas reduzidas, com conseqüente diminuição de danos oxidativos às retinas desses animais (SONG et al., 2016).

Conforme o estudo de Sun et al. (2019), o extrato de mirtilo protegeu cardiomiócitos contra a apoptose através da diminuição das EROs em um modelo *in vitro* de dano induzido por doxorubicina. Esse, foi capaz de aumentar as atividades das enzimas antioxidantes SOD e catalase, promovendo a sobrevivência de cardiomiócitos na presença de altas concentrações de noradrenalina (LOUIS et al., 2014).

Liu et al. (2015) observaram em seu estudo, que o tratamento utilizando o extrato de mirtilo rico em antocianinas nas doses de 20 e 80 mg/kg/dia mostrou-se eficaz na diminuição da pressão arterial média e da frequência cardíaca, estas aumentadas em 20 animais que receberam ciclofosfamida.

Contudo, a ingestão regular deste fruto rico em compostos fenólicos tem sido relacionada com a inibição da proliferação de células cancerígenas, prevenindo a incidência de câncer, doenças coronárias, diminuição da pressão arterial sistólica e diastólica (BASU et al., 2010), além de contribuir com a diminuição dos efeitos do envelhecimento (LI, 2012).

### 3 CONCLUSÃO GERAL REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Conclui-se, portanto que, essas cultivares de mirtilo introduzidas aqui no Brasil, apresentam desenvolvimento e produção satisfatórias nas condições edafoclimáticas da região Sul do RS, possibilitando assim, por meio do melhoramento genético a obtenção de novos genótipos com características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas superiores, sobretudo as nutracêuticas, e também mais adaptadas as nossas condições de clima e de solo.

Pois, devido as suas propriedades nutritivas e terapêuticas, percebe-se que a demanda vem aumentando, estimulando assim, a produção desses pequenos frutos que podem ser cultivadas em pequenas áreas beneficiando desta maneira não só os pequenos produtores e empresários, mas também a economia local.

Além dos efeitos benéficos a saúde humana, outra característica importante da cultura é a versatilidade do seu consumo, que pode ser consumido tanto *in natura*, quanto processada, e seu consumo traz diversos efeitos benéficos à saúde humana, contribuindo com a prevenção de doenças crônicas e envelhecimento. Esse, atribuído pela presença dos compostos fenólicos e em particular as antocianinas presentes no fruto, além de conferir propriedades antioxidantes e quimioprotetoras.

#### **4 HIPÓTESE**

Novos genótipos de mirtilheiro obtidos pelo método de seleção massal apresentam características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas superiores quando comparado aos seus genitores.

## **5 JUSTIFICATIVA**

A análise e comparação das características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas dos seis genótipos selecionados de mirtilheiro com relação as sete cultivares comerciais já consolidadas no mercado, podem apresentar superioridade, por apresentarem uma variabilidade genética entre eles e assim, conferindo melhores propriedades funcionais ao fruto.

## **6 OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo geral**

Analisar e comparar as características físico-químicas dos frutos de seis genótipos selecionados (BB3, BB4, BB6, PW1, PW2 e PW5) em relação a sete cultivares comerciais (Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Climax, Delite, Powderblue e Woodard) de mirtilheiro, oriundos de uma safra que abrange o período de novembro/2019 a janeiro/2020.

### **6.2 Objetivos específicos**

Nas diferentes amostras de mirtilo (*Vaccinium* spp.) pretende-se:

- Analisar a cor instrumental, sólidos solúveis, acidez titulável, relação SS/AT e determinação do pH;
- Averiguar as propriedades antioxidantes, por meio de diferentes protocolos;
- Determinar e analisar os compostos fenólicos totais;
- Verificar a quantidade de antocianinas totais e individuais;
- Identificar genótipos com características físico-químicas superiores.

## 7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na tabela 2 estão apresentadas as amostras, bem como as variáveis independentes e dependentes do estudo.

Tabela 2 – Número de amostras e variáveis do estudo com diferentes amostras de mirtilo.

Amostras	Variáveis	
	Independentes	Dependentes
1	Bluebelle	Cor
2	Bluegem	Sólidos solúveis
3	Briteblue	Acidez titulável
4	Climax	Relação SS/AT
5	Delite	pH/acidez
6	Powderblue	Compostos fenólicos totais
7	Woodard	Antocianinas totais
8	BB3	Antocianinas individuais
9	BB4	DPPH
10	BB6	ABTS+
11	PW1	
12	PW2	
13	PW5	

As análises serão realizadas a partir de 13 amostras, que terão 3 repetições em cada amostra, totalizando 39 amostras x 9 determinações (protocolos) = 351 determinações x 3 repetições = 1.053 determinações.

## 8 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento será conduzido no Laboratório de Fisiologia de Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), com mirtilos provenientes de uma área experimental da empresa Frutplan Mudanças LTDA, localizada no terceiro distrito de Pelotas, RS, a 31° 33' 4,13" S, 52° 23' 54,13" W e 120 m de altitude.

O clima local, segundo classificação de Koppen, é do tipo Cfa, com temperatura média anual de 17,8° C, umidade relativa média anual de 80,7% e precipitação pluvial média anual de 1.367 mm (AGROMETEOROLOGIA, 2011). O solo da região é do tipo argiloso vermelho-amarelo, segundo o Sistema Brasileiro de Classificação (SANTOS et al., 2006), adubação NPK realizada no final do mês de agosto durante a produção e após a colheita, e o pH da área experimental é 4,5, conforme a análise de solo. Também, são aplicadas caldas nas plantas (sufocálcica ou bordalesa) no período de inverno, incluindo o mês de junho ou julho, a fim de evitar o aparecimento de doenças nas mesmas.

As plantas matrizes que deram origem aos genótipos, os quais tem 13 anos de idade (BB3, BB4, BB6, PW1, PW2 e PW5), objetos deste estudo, são provenientes de um matrizeiro com 18 anos de idade, formado por sete cultivares comerciais (Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Climax, Delite, Powderblue e Woodard), sendo duas destas, 'Bluebelle' e 'Powderblue' utilizadas para a extração das sementes que originaram os mesmos. Estas, plantadas em um espaçamento de 1,5 m entre as plantas e 3 m entre as linhas.

Durante o ciclo de produção de 2019/20, os frutos em estágio de maturação completa das sete cultivares e seus genótipos, serão avaliados quanto às variáveis físico-químicas, antioxidantes e fenólicas, respectivamente: determinação instrumental da cor, sólidos solúveis, acidez titulável, relação SS/AT, determinação do pH, atividade antioxidante *in vitro*, antocianinas totais, antocianinas individuais e compostos fenólicos totais, descritas a seguir:

- **Determinação instrumental da cor:** determinada utilizando colorímetro (CR300, Minolta Chromamater), através do sistema de cor CIELab. Os parâmetros avaliados serão L, a\* e b\*, nos quais L\* (luminosidade) varia de preto (0) a branco (100), e os

parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  irão ser utilizados para calcular o ângulo Hue ( $^{\circ}\text{Hue} = \tan^{-1} b^*/a^*$ ), o qual indica a cor observada (CIE LAB, 1996).

- **Sólidos solúveis (SS)**: determinados de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (2008), a 20 °C, utilizando refratômetro digital (PR-32 $\alpha$ , Atago®) e os valores expressos em °Brix.

- **Acidez titulável (AT)**: para avaliação da acidez titulável, será utilizado o método volumétrico com NaOH 0,1 N, pesar 1 g de amostra e adicionar 40 mL de água destilada, agitar e observar o pH da amostra. Após será feita a titulação da amostra até alcançar pH 8,1. Os resultados serão realizados por meio de uma equação e expressos em mg de ácido málico por 100 g<sup>-1</sup> de amostra em massa úmida (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

$$\frac{V \times F \times M \times PM}{10 \times P \times n} = \text{g de ácido orgânico por cento m/m ou m/v}$$

- **Relação SS/ATT**: determinada pela razão entre os dois constituintes (BRASIL, 2005).

- **Determinação do pH**: Será pesada 1 g de amostra previamente macerada em bequer de 100 mL, adicionado 40 mL de água destilada, agitar o conteúdo até as partículas ficarem uniformemente suspensas, após o pH será determinado por potenciometria, em pHmetro (K392014B, Kasvi®) (AOAC, 1995).

- **Capacidade antioxidante pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)**: o método DPPH que será utilizado foi descrito por Brand-Williams et al. (1995), massaado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. Primeiramente deve-se ajustar a absorbância a 515 nm da solução de trabalho de DPPH para  $1,1 \pm 0,02$  (1,08 – 1,12). Posteriormente, será adicionado 100  $\mu\text{L}$  do extrato preparado para a determinação de compostos fenólicos, ou solvente (branco) em tubos Falcon de 15 mL. Logo após, adicionar-se-á 3,90 mL do radical DPPH recentemente preparado e

com a absorbância ajustada. Em seguida, será agitado em vórtex por 30 s e deixado em repouso por 24 h no escuro e em temperatura ambiente. Posteriormente, deve-se zerar o espectrofotômetro (marca modelo) com metanol P.A, e em seguida será realizada a leitura da absorbância das amostras e do branco em 515 nm. O experimento será realizado em triplicata e o cálculo da porcentagem de inibição da captação de radicais livres pelo DPPH segue na equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{[(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100]}{\text{Abs}_{\text{branco}}}$$

- **Análise antioxidante pela captura do radical livre ABTS<sup>+</sup>:** a capacidade antioxidante será determinada de acordo com Re et al. (1999), a partir da utilização do radical ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico). Primeiramente deve-se ajustar a absorbância a 734 nm do radical ABTS para 0,70 nm ± 0,05. Logo após, adicionar 30 µL do extrato ou 30 µL de álcool etílico (branco) em tubos Falcon de 15 mL. Posteriormente, será adicionado 3,0 mL do radical ABTS<sup>+</sup> recentemente preparado e, em seguida homogeneizado em vórtex por 30 s. Permanecerá 6 min no escuro e em temperatura ambiente. O espectrofotômetro (marca modelo) será zerado com álcool etílico P.A, sendo após realizada a leitura da absorbância das amostras e do branco em 734 nm. A quantificação da atividade antioxidante da amostra será realizada por meio de uma curva padrão preparada com trolox. O experimento será realizado em triplicata com três repetições e o cálculo da porcentagem de inibição da captação de radicais livres pelo ABTS segue na equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{[(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100]}{\text{Abs}_{\text{branco}}}$$

- **Determinação de compostos fenólicos totais pelo protocolo Folin – Ciocalteu:** o teor de compostos fenólicos totais será determinado pelo método modificado de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). A extração será realizada a partir de 1 g de massa seca de mirtilo, diluída em 20 mL de metanol P. A. e agitado em Ultra-turax a 12.000 rpm, durante 1 min, e logo após o extrato será centrifugado por 15 min a 6.000 g. O sobrenadante será armazenado em freezer a -20 ° C. Para quantificação, deve-se pipetar 250 µL do extrato, 4000 µL água destilada. Em seguida, pipetar 250 µL Folin 0,25 N e agitar os tubos em vórtex por 10 s. Aguardar 3 min de reação (no escuro) e posteriormente pipetar 500 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 N. Agitar em vórtex por 10 s e

deve-se aguardar 2 h de reação (no escuro). Em seguida, realizar a leitura da absorbância em 725 nm. O experimento será realizado em triplicata com três repetições e os resultados serão expressos em mg de ácido gálico  $100 \text{ g}^{-1}$  (equivalente ácido gálico por 100 g de massa seca de fruta), a partir de curva-padrão com ácido gálico.

- **Determinação de antocianinas monoméricas totais:** O conteúdo total de antocianinas será estimado segundo o método de Lee (2005). Primeiramente deve-se pesar 1 g de amostra em tubos Falcon de 50 mL envoltos com papel alumínio. Logo após, adicionar 25 mL de solução contendo 85% de metanol e 15% de HCl 1,5 N aos tubos. Em seguida, agitar por 60 min em agitador de tubos e centrifugar por 15 min/5000 g /5° C. Após, deve-se coletar o sobrenadante em tubos Falcon de 15 mL (avolumar o extrato final utilizando metanol: HCl 1,5 N (85:15) envoltos com papel alumínio e armazenar o extrato em freezer (-20° C). A leitura será realizada da absorbância dos extratos a 520 nm. O conteúdo de antocianinas totais foi expresso como equivalentes de Pelargonidina ( $\text{mg Plg } 100\text{g}^{-1}$ ), de acordo com a equação linear da curva analítica de Pelargonidina (em concentrações de 2,60 a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A equação da curva analítica será  $y=0,1111x + 0,0013$ ,  $r^2=0,9991$ .

- **Determinação de antocianinas individuais:** para a extração de antocianinas será utilizado o método adaptado de Zhang (2004), que consiste na extração do pigmento com uma solução de metanol e ácido clorídrico (99,9:0,1v/v), seguida de uma agitação por três h, filtração, concentração em rotaevaporador a 30° C por 20 min e dissolução em solução de metanol com 1% de HCl. Após o extrato será centrifugado (7.000 g por 10 min), sendo então injetada uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  no cromatógrafo líquido. O sistema cromatográfico utilizado será no comprimento de onda do detector de 520 nm. A fase móvel consiste em um gradiente de eluição (Tabela 3) com solução aquosa de ácido acético (98:2, v/v), metanol e acetonitrila, com fluxo de  $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e tempo total de corrida de 40 min.

Tabela 3 – Programa do gradiente de eluição dos solventes para separação de antocianinas em mirtilo (*Vaccinium* spp.).

Tempo (minutos)	Fase móvel	Fase móvel (%)
0	A	100
	B	0
	C	0
10	A	90
	B	0
	C	10
15	A	80
	B	10
	C	10
20	A	80
	B	10
	C	10
25	A	80
	B	10
	C	10
30	A	70
	B	0
	C	30
35	A	70
	B	0
	C	30
40	A	100
	B	0
	C	0

Solvente A: solução aquosa de ácido acético (98:2, v/v); Solvente B: metanol; Solvente C: acetonitrila.

Os picos serão identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões e quantificados através de curvas de calibração de padrão externo de cloreto de malvidina, cloreto de kuromanina (cianidina-3-glicosídeo), cloreto de keracianina (cianidina-3-rutinosídeo), cloreto de pelargonidina, cloreto de peonidina, cloreto de

delfinidina, cloreto de cianidina e malvidina-3-galactosídeo. Os resultados serão expressos em mg da antocianina individual  $100^{-1}$  g de amostra.

Para a realização destas análises, a cada genótipo e cultivar, será colhido 1 kg de frutos em estágio completo de maturação, ou seja, quando a epiderme apresentar coloração totalmente preta ou azulada por completo. A colheita será realizada em cumbucas plásticas devidamente identificadas e para a comparação das características físico-químicas das seis seleções com as sete cultivares, serão escolhidos e marcados com fita três clones de cada cultivar.

No dia seguinte levada ao laboratório, onde as amostras serão separadas em duas partes, de acordo com as análises. Parte desses frutos destinados as análises de cor, sólidos solúveis, acidez titulável, pH e antocianinas totais serão pesados separados por repetição de 100 g (R1, R2 e R3) e acondicionadas em sacos plásticos com fecho zíper, posteriormente congeladas e mantidas em freezer com temperatura de  $-20^{\circ}$  C.

A outra parte dos frutos passará pelo mesmo procedimento anterior, no entanto, as repetições serão compostas por amostras de 200 g que serão armazenadas em ultrafreezer com temperatura de  $-80^{\circ}$  C até serem liofilizadas em liofilizador (Liobrás - L101), e posteriormente acondicionadas em tubos Falcon com capacidade para 45 mL e mantidas sob congelamento. Essas amostras de massa seca serão utilizadas para as análises antioxidantes, compostos fenólicos totais e também para determinar a quantidade de antocianinas individuais nos frutos.

### **Análise estatística**

Os dados serão analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias (teste Tukey), tomando como massa os níveis de significância maiores que 95% ( $p < 0,05$ ). Para calcular o coeficiente de correlação entre os resultados, será aplicado o teste de correlação de Person e a análise estatística será realizada utilizando o programa Statistica 8.0 (Stat Soft. Inc., USA).

### **8.1 Origem dos genótipos**

Os genótipos que serão utilizados foram selecionados em um experimento anterior de Fischer (2013), onde os mesmos foram obtidos pelo método de seleção massal em uma população inicial composta de 3.554 plantas propagadas por sementes provenientes de três cultivares (Bluebelle, Bluegem e Powderblue) implantadas em uma área composta por mais cinco cultivares (Briteblue, Climax, Delite e Woodard), sendo portanto também seus possíveis genitores.

## **9 RESULTADOS ESPERADOS**

Espera-se, com os resultados identificar entre as seleções, genótipos com características físico-químicas, antioxidantes e fenólicas superiores em relação aos seus genitores.

Bem como, a elaboração de artigos científicos e resumos para eventos, durante este período da Pós-Graduação, que irão contribuir e agregar conhecimentos a pesquisa.



## 11 ORÇAMENTO

Na tabela 5 estão apresentados os materiais e insumos necessários para a execução do projeto de pesquisa.

Tabela 5 – Materiais e insumos necessários para a execução do projeto de pesquisa.

<b>Materiais</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor unitário (R\$)</b>	<b>Valor (R\$)</b>
Metanol	7 L	23,50	164,50
Etanol	2 L	15,45	30,90
Trolox	1 g	309,00	309,00
Radical ABTS	1 g	592,00	592,00
Radical DPPH	1 g	844,50	844,50
Ácido Gálico	100 g	75,00	57,00
Carbonato de Sódio	1 kg	7,50	7,50
Ácido acético UV/HPLC	2 L	33,33	66,66
Acetonitrila UV/HPLC	2 L	100,00	200,00
Metanol UV/HPLC	3 L	25,00	75,00
Persulfato de Potássio	250 g	24,40	24,40
Tubos Falcon	50 unidades	0,68	34,00
Sacos zip lock	100 unidades	0,27	27,00
Etiquetas	4 folhas	2,00	8,00
Papel alumínio	2 unidades	4,00	8,00
<b>TOTAL</b>			<b>R\$ 2.447,74</b>

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL A.; GUPTA S.; SHARMA R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 28, 2005.
- AGROMETEOROLOGIA – FAEM/UFPEL: normais climatológicas mensais do período 1971/2000.
- ALKHALF M.I., KHALIFA F.K. Blueberry extract attenuates  $\gamma$ -radiation-induced hepatocyte damage by modulating oxidative stress and suppressing NF- $\kappa$ B in male rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 7, p. 1272-1277, 2018.
- ANTUNES, L. E. C. Amora Preta: Nova Opção de Cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, p. 151-158, 2002.
- ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. do C. B.; VIZZOTO, M.; PAGOT, E. A cultura do mirtilheiro: morfologia da cultura. In: KRETZSHMAR, A. A.; RUFATO, L.; PELIZZA, T. R. (Org.). **Pequenas Frutas**. Florianópolis: UDESC, p. 15-51, 2013.
- ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. do C.B. (Ed.). **Cultivo do mirtilo (*Vaccinium sp.*)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 99p. (Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção, 8).
- ANTUNES, L. E. C; GONÇALVES, E. D; RISTOW, N. C.; CARPENEDO, S.; TREVISAN, R. Fenologia, produção e qualidade dos frutos de mirtilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1011-1015, 2008.
- ANTUNES, L. E. C; GONÇALVES, E. D; TREVISAN, R. Instalação e manejo do pomar. In: RASEIRA, M. do C. B; ANTUNES, L. E. C. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.35-40. (Documento, 121).
- ASSOCIATION OF OFFICIALANALYTICAL CHEMISTRY. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 15 th. 33E. Washington, 1995. 2v.
- BASU, A.; MISTI, M. D.; LEYVA, J.; SANCHEZ, K.; BETTS, N. M.; MINGYUAN, W.; ASTON, C. E.; LYONS, T. J. Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 9, p. 1582-1587, 2010.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 1018p., 2005.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Revista de Nutrição**, v. 56, n. 11, p. 317-33, 1998.

BRUCKNER, C. H.; MELETTI, L. M. M.; OTONI, W. C.; ZERBINI JÚNIOR, F. M. Maracujazeiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, p.373-410, 2002.

CANTUARIAS- AVILES, T.; SILVA, S. R.; MEDINA, R. B.; MORAES, A. F. G.; ALBERTI, M. F. Cultivo do Mirtilo: Atualizações e desempenho inicial de variedades de baixa exigência em frio no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 139-147, 2014.

CARDEÑOSA, V.; GIRONES-VILAPLANA, A.; MURIEL, J. L.; MORENO, D. A.; MORENO-ROJAS, J.M. Influence of genotype, cultivation system and irrigation regime on antioxidant capacity and selected phenolics of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). **Food Chemistry**, v.202, n.1, p. 276-283, 2016.

CARVALHO, F. I. F. de. LORENCETTI, C.; MARCHIORO, V. S.; SILVA, A. S. Métodos de melhoramento em plantas alógamas. In: \_\_\_\_\_. **Condução de populações no Melhoramento Genético de Plantas**. Pelotas: UFPEL, 2003. p. 102-175.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859–871, 2009.

CASTREJÓN, A. D. R.; EICHHOLZ, I.; ROHN, S.; KROH, L. W.; HUYSKENS-KEIL, S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) during fruit maturation and ripening. **Food Chemistry**, v. 109, n. 3, p. 564-572, 2008.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H.R.N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 3, p.113-118, 2007.

CHU, W.; CHEUNG S. C. M.; RAW, et al. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) In: Benzie IFF, Wachtel-Galor, S. editors et al. **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**. 2ª ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2011.

CIA, P.; BRON, I. U.; VALENTINI, S. R. T.; PIO, R.; CHAGAS, E. A.; Atmosfera modificada e refrigeração para conservação pós-colheita da amora-preta. **Journal Bioscience**, v. 23, n. 3, p. 11-16. 2007.

CIE LAB - Commission Internationale de l'Eclairage. Colorimetry. Vienna: CIE publication, 2 ed, 1996.

CONNOR, A. M.; LUBY, J. J.; TONG, B. S.; FINN, C. E.; HANCOCK, J. F. Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 127, p. 89–97, 2002.

- COTON, M.; PAWTOWSKI, A.; TAMINIAU, B.; BURGAUD, G.; DENIEL, F.; COULLOUME-LABARTHE, L.; FALL, P.A.; DAUBE, G.; COTON, E. Unravelling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture massad methods. **Technopôle de Brest Iroise**, v.1, n.1, p. 1- 41, 2016.
- DUFFY, K. B.; SPANGLER, E. L.; DEVAN, B. D.; GUO, Z.; BOWKER, J. L.; JANAS, A. M.; HAGEPANOS, A.; MINOR, R. K.; DECABO, R.; MOUTON, P. R.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A.; INGRAM, D. K. A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats. **Neurobiology of Aging**, v. 29, p. 1680-1689, 2008.
- ENGLAND, G.K. An overview of the blueberry industry in Florida. **Journal of the American Pomological Society**, v. 69, n.1, p.2-3, 2015.
- FACHINELLO, J. C. Mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 285-576, 2008.
- FAOSTAT. Área colhida, produtividade e produção de mirtilo na América do Sul. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 09 jun. 2020.
- FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. 4. ed. New York: CRC Press, 2008. 1144 p.
- FISCHER, D. L. O. **Seleção de genótipos de mirtilheiro obtidos através de polinização aberta**. 2013. 97f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2013.
- FONSECA, T.R. **Efeitos do exercício físico e do extrato de soja no perfil lipídico, no estresse oxidativo e na aterosclerose em camundongos deficientes do gene para o receptor de LDL**. 2007. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- GIOVANELLI, G.; BURATTI, S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. **Food Chemistry**, v. 112, p. 903-908, 2008.
- GOLDMEYER, B.; PENNA, N. G.; MELO, A.; DA ROSA, C. S. Características físico-químicas e propriedades funcionais tecnológicas do bagaço de mirtilo fermentado e suas farinhas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n.4, p.980-987, Dez. 2014.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radical in biology and medicine**. 3 ed. Claredon: Oxford, 2000. 968 p.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3 ed. Oxford: Oxford University, 2007. 896 p.
- HAYASHI, K. **The chemistry of flavonoid compounds**. The MacMillian Company: New York, 1962.
- HOFFMAN, A.; ANTUNES, L. E. C. Mirtilo: Grande Potencial. **Cultivar – hortaliças e frutas**. v. 5, p. 28-30. 2004.

- HOWARD, L. R.; CLARK, J. R.; BROWNMILLER, C. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 1238–1247, 2003.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3 ed. São Paulo: IMESP, 1985.
- KANG, J.; THAKALI, K.M.; JENSEN, K.M.; WU, X. Phenolic acids of the two major blueberry species in the US market and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.70, n.1, p.56-62, 2015.
- KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia vegetal**. 2ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2012.
- KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 50, n. 2, p. 213-218, 1999.
- KOWALCZYK, E., KRZESINSKI, P., KURA, M., SZMIGIEL, B. e BLASZCZYK, J. Anthocyanins in medicine. **Polish Journal of Pharmacology**, v.55, p.699-702. 2003.
- KRAUJALYTE, V.; VENSKUTONIS, P. R.; PUKALSKAS, A.; CESONIENE, L.; DAUBARAS, R. Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. **Food Chemistry**, v. 188, p. 583-590, 2015.
- LANDER, H. M. Activation of the receptor for advanced glycation and products triggers a p21 ras-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 28, p. 17810-17814, 1997.
- LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-7, 2005.
- LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analysis in Cranberries. **Hortiscience**, v.7, n.1, p.83-84, 1972.
- Li, C., et al., Composition of Polyphenols and Antioxidant Activity of Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei*) in Nanjing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 523-531, 2012.
- LI, D.; MENG, X.; LI, B. Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.47, p.1-7, 2016.
- LIU, B.; FANG, W.; YI, R.; ZHAO, X. Preventive effect of blueberry extract on liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. **Foods**, v. 8, n. 2, 2019.
- LIU, Y.; TAN, D.; SHI, L.; LIU, X.; ZHANG, Y.; TONG, C.; SONG, D.; HOU, M. Blueberry anthocyanins-enriched extracts attenuate cyclophosphamide-induced cardiac injury. **PLoS One**, v. 10, n.7, p. 127-813, 2015.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T. J., et al. Flavonóides, Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, v. 3, n.14, p.18-22, 2000. LOPES, T.J., **Adsorção de antocianinas de repolho roxo em argilas**. Florianópolis, 2002, 121p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina.

LÓPEZ O. P.; JIMÉNEZ A. R.; VARGAS F. D. et al. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability, **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v.40, n.3, p.173-289, 2000.

LOUIS X. L.; THANDAPILLY, S. J.; KALT, W.; VINQVIST-TYMCHUK, M.; ALOUD, B.M.; RAJ, P.; YU, L.; LE, H.; NETTICADAN, T. Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress. **Food & Function**, v. 5, n. 8, p. 1785-94, 2014.

MARÇO, P. H; POPPI, R. J; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, 1218-1223, 2008.

MATOS, S.; GUINÉ, R. P. F.; GONÇALVES, F.; TEIXEIRA, D. Avaliação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante em mirtilos de diferentes proveniências geográficas. **Neonatology**, v. 100, p. 319– 341, 2014.

MOTA, R. V. Caracterização física e química de geléia de amora-preta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 539-543. 2006.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; JOSÉ NÚÑEZ, M.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal Chromatogr A**, v. 1054, n. 1/2, p. 95-111, 2004.

PAGANINI, A. H. El cultivo del arándano. **Revista Hortícola, Agroguias.com**.

Disponível em:

<[http://www.agrobit.com/Info\\_tecnica/alternativos/horticultura/AL\\_000001ho.htm](http://www.agrobit.com/Info_tecnica/alternativos/horticultura/AL_000001ho.htm)>.

Acesso em: 25 de mar. de 2020.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. Seminário brasileiro sobre pequenas frutas, Vacaria, RS. Anais Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho**, 2003. p. 9-17 (Documentos 37).

PAYNE, T. J. Formulating with blueberries for health. **Cereal Foods World**, v. 50, n. 5, p. 262-264, 2005.

RASEIRA, M do C. B. Classificação botânica, descrição da planta, melhoramento genético e cultivares. In: RASEIRA, M. do C. B.; ANTUNES, L. E. C. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p. 15-28. (Documento, 121).

RASEIRA, M do C. B.; FRANZON, R. C. Melhoramento genético e cultivares de amora-preta e mirtilo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.33, n.268, p.11-20, 2012.

RE, R. Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237. 1999.

REQUE, P. M. **Frutos de Mirtilo (*Vaccinium spp.*) e produtos derivados: Caracterização e estabilidade de suas propriedades bioativas**. Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 120p. 2012.

RETAMALES, J. B.; MENA, C.; LOBOS, G.; MORALES, Y. A. regression analysis on factors affecting yield of highbush blueberries. **Scientia Horticulturae**, v.186 p.7-14. 2015.

RIBÉREAU-GAYON, Pascal. **Les composes phénoliques des végétaux**. Dunod: Paris, 1968.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. **Comunicado Técnico, 128 Embrapa**, p. 3–6, 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2002.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; OLIVEIRA, J. B.; COELHO, M. R.; LUMBRERAS, J. F.; CUNHA, T. J. F. (ed.) **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306p.

SARAL, Ö.; ÖLMEZ, Z.; SAHIM, H. Comparison of antioxidant properties of wild blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L. and *Vaccinium myrtillus* L.) with cultivated blueberry varieties *Vaccinium corymbosum* L. in Artivin Region of Turkey. **Turkish Journal of Agriculture- Food Science and Tecnology**, v. 3, p. 40-44, 2015.

SCALZO, J.; STEVENSON D.; HEDDERLEY D. Blueberry estimated harvest from seven new cultivars: Fruit and anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 139, p. 44-50, 2013.

SEERAM, N. P. Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 630-635, 2008.

SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; ZHANG, Y.; SAND, D.; HEBER, D. 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**, v. 54, p. 9329-9339, 2006.

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.

SHAHIDI, Fereidoon.; NACZK, Marian. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic, 1995.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SILVA, J. F.; KUNZ, S. N.; MISSAU, F. C. Avaliação da capacidade antioxidante do mirtilo e comparação com acerola, uva-rosa e suco de uva-roxa. **Anais do 8º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão – Universidade Federal do Pampa**, v. 8, n. 2, 2016.

SILVA, P. R. Mercado e comercialização de amora, mirtilo e framboesa. **Análises e Indicadores do Agronegócio**. v.2, n.12, 2007. 6p.

SILVA, S. D. A. E.; ANTUNES, L. E. C.; ANTHONISEN, D. G.; LEMÕES, J. S.; GONÇALVES, E. D. Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 180- 184, 2008.

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

SKORAVANKOVA, S.; SUMCZYNSKI, D.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; SOCHOR, J. Different types of berries. **International Journal of. Mol. Science**. v. 16, p. 2463-2470, 2015.

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

SONG Y. et al. Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through Nrf2/HO-1 signaling. **Journal of Neuroimmunology**, v. 301, p. 1-6, 2016.

SOUZA, M. B.; CURADO, T.; VASCONCELLOS, F. N.; TRIGO, M. J. Mirtilo: Qualidade pós colheita. **Folhas de Divulgação AGRO**, v. 556, n. 8, 2007.

SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; SILVA, T. L. T.; LIMA, L. C. O.; QUEIROZ, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruit. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362-368, 2014.

SUN Y. et al. Blueberry extract attenuates doxorubicin-induced damage in H9c2 cardiac cells. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 97, n. 9, p. 880-88, 2019.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 297-304, 2008.

VIZZOTO, M.; PEREIRA, M. C. Metodologia científica: otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). **Embrapa Clima Temperado**, Pelotas, Boletim de pesquisa e desenvolvimento 101, 19p, 2009.

WANG, S. Y.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Antioxidant capacity and  $\alpha$ glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium spp.*) cultivars. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1759-1768, 2012.

WANG, S. Y.; CHEN, C. T.; SCIARAPPA, W.; WANG, C. Y.; CAMP, M. J. Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5788-5794, 2008.

WANG, S. Y.; CHEN, H.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Genotype and growing season influence blueberry antioxidant capacity and other quality attributes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 1540–1549, 2012.

WOLFE, K. L.; KANG, X.; HE, X.; DONG, M.; ZHANG, Q.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8418-8426, 2008.

ZHANG, Y.; HU, X. S.; CHEN, F. et al. Stability and color characteristics of PEF treated cyaniding-3-glicoside during storage. **Food Chemistry**, v.106, p. 669- 679, jan, 2008.

ZHANG, Z.; KOU, X. L.; FUGAL, K.; MCLAUGHLIN, J. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.52, n.4, p.688-691, 2004.

## **2 RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO**

## **1 Logística do trabalho de campo**

O trabalho de campo teve início na primeira quinzena de dezembro de 2019 e foi concluído no mês de fevereiro de 2021, sendo coordenado por uma mestranda, um mestrando e uma doutoranda, ocasião em que foram realizadas as seguintes atividades:

- A colheita das amostras ocorreu na primeira quinzena de dezembro/2019 a janeiro/2020;
- Deu-se início a organização, preparo do material e atividades laboratoriais em dezembro de 2019;
- A finalização das atividades laboratoriais ocorreu em fevereiro de 2021;
- A organização dos dados e a análise estatística foram realizadas em março de 2021.

## **2 Modificações do projeto de pesquisa**

Poucas alterações ocorreram do projeto de pesquisa para a dissertação, e dentre as modificações, acrescentou-se a análise de flavonoides totais, a fim de tornar os resultados do estudo mais completos. Em relação a quantificação das antocianinas individuais por cromatografia, foi possível obter apenas os resultados referentes as cultivares comerciais a tempo da defesa da dissertação, e este fato deve-se em virtude das restrições ao laboratório de pesquisa, em decorrência da pandemia causada pela Covid-19. Assim, a medida que os resultados ficarem prontos, os mesmos poderão ser incluídos no artigo que será submetido para publicação.

Outra modificação, foi em relação a quantificação dos resultados das análises de antioxidantes, a qual constava no projeto de pesquisa que seria por meio de cálculo de inibição, porém optou-se realizar por meio de curva analítica, pois verificou-se que em outros estudos semelhantes presentes na literatura, os resultados são efetuados desta forma, e também pela questão da padronização com as demais análises.

Por fim, optou-se por realizar as reações de antioxidantes, fenólicos, flavonoides e antocianinas totais em microplacas contendo 96 poços ao invés de realizar as reações em tubos Falcon, pois como haviam muitas amostras, ao utilizar as microplacas, a leitura das mesmas no espectrofotômetro tornou-se mais viável.

### **3 Digitação e processamento de dados**

Os dados foram digitados e organizados em planilhas no Excel, na sequência foram transferidos para o programa o programa R (R Core Team, 2019), e analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias (teste de Tukey), tomando como massa os níveis de significância maiores que 95% ( $p \leq 0,05$ ). Além disso, para calcular o coeficiente de correlação entre os resultados, aplicou-se o teste de correlação de Person.

### **4 Resultados gerais**

Diante dos resultados obtidos no trabalho de campo, observou-se que os genótipos e as cultivares avaliadas, conferiram altos teores de antioxidantes, fenólicos, flavonoides, antocianinas totais e individuais. Destacando-se 'Bluegem', 'Briteblue', 'Climax', 'Delite' e os genótipos PW1, PW2, PW5 e BB3. Concluiu-se que os genótipos estudados não apresentaram superioridade em relação aos seus genitores e possíveis genitores. No entanto, os mesmos possuem tanto potencial funcional quanto as cultivares já consolidadas no mercado. Além de serem promissores para o cultivo nas regiões mais frias do Brasil, uma vez que foram cultivados e selecionados no Sul do Rio Grande do Sul.

**3 ARTIGO**

**Artigo formatado de acordo com as normas do Journal of Food Composition and Analysis**

Disponível em:

[https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/622878?generatepdf=true](https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/622878?generatepdf=true)

1  
2 **Caracterização físico-química, composição fenólica e atividade antioxidante de genótipos e**  
3 **cultivares comerciais de frutos de mirtilheiro (*Vaccinium* spp.)**  
4

5 Amanda Radmann Bergmann<sup>a,\*</sup>, Tatiane Jéssica Siebeneichler<sup>b</sup>, Lucas de Oliveira Fischer<sup>c</sup>, Igor  
6 Ratzmann Holz<sup>c</sup>, César Valmor Rombaldi<sup>b,d</sup>, Doralice Lobato de Oliveira Fischer<sup>e</sup>, Catia Silveira da  
7 Silva<sup>a,f</sup>, Elizabete Helbig<sup>a,g</sup>  
8

9 <sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPel),  
10 Pelotas, RS, Brasil.

11 <sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de  
12 Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

13 <sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS,  
14 Brasil.

15 <sup>d</sup> Professor Associado da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), no  
16 Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA), Pelotas, RS, Brasil.

17 <sup>e</sup> Professora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-rio-grandense (IFSul),  
18 Campus Pelotas Visconde da Graça (CaVG), Pelotas, RS, Brasil.

19 <sup>f</sup> Pós-Doutoranda da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Faculdade de Nutrição, Pelotas, RS,  
20 Brasil.

21 <sup>g</sup> Professora Associada da Faculdade de Nutrição, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel),  
22 Pelotas, RS, Brasil.

24 **Endereços de e-mail:**

25 Tatiane Jéssica Siebeneichler: tatijs1@hotmail.com

26 Lucas de Oliveira Fischer: fischerlucas@hotmail.com

27 Igor Ratzmann Holz: igorholzz@gmail.com

28 César Valmor Rombaldi: cesarvrf@ufpel.edu.br

29 Doralice Lobato de Oliveira Fischer: doralicefischer@yahoo.com.br

30 Catia Silveira da Silva: catiassilveira@gmail.com

31 Elizabete Helbig: helbignt@gmail.com

32 **\* Autor correspondente**

33 Amanda Radmann Bergmann

34 Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas. Rua Gomes Carneiro, 01 – Centro, Pelotas  
35 - RS, CEP 96010-610, Brasil.

36 Tel: +55 (53) 991610108

37 E-mail: amandarbergmann@outlook.com

38

39

40

41

42

43

44

## 45 **Destaques**

- 46 • Os genótipos de mirtilo apresentaram elevado teor de compostos fitoquímicos.
- 47 • Características genéticas alteram a atividade antioxidante e fenólica dos mirtilos.
- 48 • Cultivares e genótipos possuem potencial industrial e para o consumo *in natura*.
- 49 • As seleções são promissoras para a Região Sul do Rio Grande do Sul.

50

## 51 **Resumo**

52 Fez-se a caracterização físico-química, potencial antioxidante e composição fenólica de frutos de seis  
53 genótipos (BB3, BB4, BB6, PW1, PW2 e PW5) e sete cultivares comerciais (Bluebelle, Bluegem,  
54 Briteblue, Climax, Delite, Powderblue e Woodard) de mirtilo, oriundos do ciclo de produção  
55 2019/2020. Analisou-se a cor, teor de sólidos solúveis, o pH, a acidez titulável, atividade antioxidante  
56 (DPPH e ABTS), compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas totais e antocianinas  
57 individuais. De modo geral, todos os genótipos e cultivares são ricos em compostos fitoquímicos.  
58 Como destaque estão os genótipos PW1, PW2, PW5, BB3 e as cultivares Bluegem, Briteblue, Climax  
59 e Delite. Assim, os genótipos de mirtilo do presente estudo, são considerados tão promissores para  
60 a indústria alimentícia e também para o consumo *in natura* quanto as cultivares comerciais já  
61 consolidadas no mercado da fruticultura, tendo em vista a excelente composição fenólica presente  
62 nestes pequenos frutos.

63 *Palavras-chave:* *Vaccinium ashei* Reade; variabilidade genética; pequenos frutos; fitoquímicos;  
64 antocianinas.

65

66

67

## 68 1. Introdução

69 Mirtilos são frutos do gênero *Vaccinium*, pertencentes à família Ericaceae, que vêm sendo  
70 amplamente estudados (Wang et al., 2015), pela importância econômica (Tan et al., 2018), nutricional  
71 (Scalzo et al., 2013; Upadhaya and Dwivedi, 2019) e funcional (Gallardo et al., 2018; Kraujalytė et  
72 al., 2015). Pelas pequenas dimensões (aproximadamente 1,0 a 1,8 cm de diâmetro e massa média  
73 variando de 1,0 a 2,2 g), os mirtilos são frequentemente denominados pequenos frutos (Raseira,  
74 2004), e, pela riqueza fitoquímica, são também denominados de “superfrutos” (Stevenson and Scalzo,  
75 2012). Assim, surgem os “pequenos superfrutos”.

76 A produção de mirtilos se destaca em países como Estados Unidos e Canadá, maiores produtores  
77 mundiais (Cantuarias-Avilés et al., 2014). No Brasil, a produção de mirtilo em escala comercial  
78 iniciou aproximadamente nos anos 1990 (Moraes et al., 2007) e estima-se que a produção cresceu  
79 atingindo aproximadamente 400 ha no ano de 2014, apesar de não existirem estatísticas oficiais  
80 atualizadas (Cantuarias-Avilés et al., 2014). Essa produção se dá majoritariamente nas regiões de  
81 climas ou microclimas sub-tropicais e temperado (Pertuzatti et al., 2021). As cultivares de maior  
82 expressão são provenientes do grupo rabbiteye (*Vaccinium ashei* Reade) e highbush (*Vaccinium*  
83 *corymbosum* L.) (Pertuzatti et al., 2016). Dentre elas, as pertencentes ao grupo highbush são mais  
84 demandadoras de horas de frio para a plena produção, necessitando em torno de 650 a 800 horas,  
85 enquanto as cultivares oriundas do grupo rabbiteye são menos exigentes em baixas temperaturas,  
86 brotando e florescendo bem com apenas 360 horas de frio (Raseira, 2004), devido a sua rusticidade,  
87 conferindo assim, excelente adaptação às condições de clima temperado, favorecendo o crescimento  
88 e o desenvolvimento das plantas, conseqüentemente gerando frutos de alta qualidade nutricional e  
89 comercial (Schuchovski et al., 2020).

90 Além da boa aparência e sabor, os mirtilos se destacam pela riqueza em compostos de importância  
91 nutricional e funcional (Connor et al., 2002; Prior et al., 1998). Há consenso de que se tratam de frutos  
92 ricos em compostos fenólicos, com destaque para ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas  
93 (Gavrilova et al., 2011; Martín-Gómez et al., 2020; Pertuzatti et al., 2016). Como consequência, esses

94 frutos são caracterizados como fonte significativa de antioxidantes (Stevenson and Scalzo, 2012),  
95 seja quando são consumidos na forma in natura ou processada (Goldmeyer et al., 2014).

96 Vários estudos que abordam a composição química, potencial antioxidante e características  
97 nutricionais e funcionais, in vitro e in vivo, apontam para o potencial qualitativo de mirtilos na  
98 nutrição humana (Bell et al., 2017; Debnath-Canning et al., 2020; Giacalone et al., 2011; Gündüz et  
99 al., 2015; Huang et al., 2016; Klimis-Zacas et al., 2016; Li et al., 2017; Lin et al., 2020; McAnulty et  
100 al., 2019; Miraghajani et al., 2020; Sun et al., 2020; Travica et al., 2020; Zhu et al., 2017). Por essa  
101 razão, associada ao custo de produção, faz dos mirtilos in natura, ou na forma processada em sucos,  
102 polpa, cremes, sorvetes, cookies, extratos e outros, frutos de relevância internacional (Chu et al.,  
103 2011).

104 Embora a maioria dos estudos apontem para benefícios à saúde humana, o conhecimento  
105 consolidado acerca do tema foi construído por estratégias indutivas e dedutivas, a partir dos estudos  
106 que verificaram que realmente há interferências com experimentações in vivo (Bell et al., 2017;  
107 Huang et al., 2016; Klimis-Zacas et al., 2016; McAnulty et al., 2019; Miraghajani et al., 2020; Zhu  
108 et al., 2017). Nesses trabalhos se observou que o consumo de mirtilos contribui para a atenuação da  
109 ocorrência de algumas doenças crônicas, como neurodegenerativas (Travica et al., 2020), diabetes  
110 (Bell et al., 2017) e cardiovasculares (Huang et al., 2016; Klimis-Zacas et al., 2016; McAnulty et al.,  
111 2019; Miraghajani et al., 2020; Zhu et al., 2017). Esses benefícios foram atribuídos a compostos como  
112 os polifenóis, particularmente devido a presença das antocianinas (Li et al., 2017).

113 Ao se identificarem os principais compostos fitoquímicos em mirtilos, se observou que os mais  
114 frequentes e em maiores concentrações são os ácidos fenólicos, incluindo o ácido gálico, cafeico,  
115 ferúlico, siríngico, clorogênico e hidroxibenzoico (Figueira et al., 2016; Skrede et al., 2000; Souza,  
116 2017; Wang et al., 2012), os flavonoides como a catequina, epicatequina, quercetina, miricetina e  
117 caempferol (Pertuzatti et al., 2021) e as antocianinas, as quais são derivadas de cinco principais  
118 antocianidinas, como a delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina (Pertuzatti et al.,  
119 2016). Além disso, está demonstrado que há variações significativas entre grupos, cultivares e em

120 locais plantio dos mirtilos (Spinardi et al., 2019), tanto no que tange ao comportamento agrônômico,  
121 quanto fitoquímico (Mikulic-Petkovsek et al., 2012). Também, está demonstrado que a composição  
122 varia quando um mesmo genótipo é cultivado em diferentes regiões (Skrovankova et al., 2015) .

123 Desse modo, tornam-se relevantes pesquisas descritivas que revelem a composição de cultivares  
124 universais em cada região de produção (Gündüz et al., 2015; Pertuzatti et al., 2021; Scalzo et al.,  
125 2015; Spinardi et al., 2019; Wang et al., 2017; Yousef et al., 2013; Zeng et al., 2020; Zhang et al.,  
126 2020). Assim, nos estudos citados acima se observou que ao analisarem diversas cultivares de mirtilo  
127 em diferentes países, se obteve divergências significativas na composição fenólica destes frutos.  
128 Embora se trate de uma pesquisa majoritariamente descritiva tem-se a hipótese de que os mirtilos de  
129 todas cultivares e genótipos estudados tenham riqueza fitoquímica, independentemente de suas  
130 particularidades genéticas (Wang et al., 2012). Portanto, se teve por objetivo com este estudo, analisar  
131 e comparar a composição fenólica e a atividade antioxidante dos frutos de seis genótipos  
132 selecionados, em relação a sete cultivares comerciais de mirtilheiro.

133

## 134 **2. Material e métodos**

### 135 *2.1 Produtos químicos e reagentes*

136 Os reagentes utilizados nas análises do estudo são da marca Sigma, denominados respectivamente  
137 por DPPH (2,2-difenil 1-picril-hidrazil), ABTS (2,2-azino-bis (3 etilbezotiazolína)-6-ácido sulfônico  
138 e Folin-Ciocalteu. Os demais solventes e outras substâncias utilizadas nos protocolos foram: etanol,  
139 metanol, carbonato de sódio, persulfato de potássio, cloreto de alumínio, hidróxido de sódio, nitrito  
140 de sódio, ácido fórmico, ácido gálico e catequina. Para a quantificação das antocianinas individuais,  
141 assim como para a quantificação dos resultados das análises, utilizaram-se os padrões malvidina-3-  
142 O-glicosídeo; malvidina-3-O-galactosídeo; cianidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-galactosídeo;  
143 delphinidina-3-O-galactosídeo.

144

## 145 2.2 Origem, colheita e armazenamento das amostras

146 Os frutos utilizados no estudo são provenientes de um matrizeiro formado por sete cultivares  
147 comerciais com 18 anos de idade (Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Climax, Delite, Powderblue e  
148 Woodard) e de seis genótipos com 13 anos de idade (BB3, BB4, BB6, PW1, PW2 e PW5), oriundos  
149 de uma área experimental, localizada no terceiro distrito de Pelotas, RS, a 31° 33' 4,13" S, 52° 23'  
150 54,13" W e 120 m de altitude. Sendo duas destas 'Bluebelle' e 'Powderblue' utilizadas para a extração  
151 das sementes que originaram os genótipos, por meio de polinização livre em estudo anterior,  
152 selecionados por meio de seleção massal, em uma população inicial composta de 3.554 plantas  
153 propagadas, implantadas em uma área composta por mais cinco cultivares (Bluegem, Briteblue,  
154 Climax, Delite e Woodard), sendo portanto também seus possíveis genitores e objetos deste estudo.  
155 As áreas de plantio foram conduzidas com manejos e tratos culturais recomendados para a cultura. A  
156 adubação foi realizada conforme análise de solo, e como não há defensivos químicos registrados para  
157 a cultura no Brasil, para o tratamento de inverno aplicou-se nas plantas calda sulfocálcica na  
158 concentração de 2%, durante o mês de junho, a fim de evitar o surgimento de doenças fúngicas.

159 O solo da região é do tipo argiloso vermelho-amarelo e o clima local, segundo classificação de  
160 Koppen, é do tipo Cfa, com temperatura média anual de 17,8° C, umidade relativa média anual de  
161 80,7% e precipitação pluvial média anual de 1.367 mm (Agrometeorologia, 2019).

162 Durante o ciclo de produção de 2019/20, na metade da primeira quinzena de dezembro foram  
163 colhidos aproximadamente 1 kg de frutos em três clones de cada cultivar e nos genótipos, em estágio  
164 completo de maturação, caracterizado pela coloração da epiderme azul-escura, dentro de cumbucas  
165 plásticas devidamente identificadas, sendo 100 g de amostra destinadas para a realização das análises  
166 físico-químicas (cor, pH, acidez titulável, sólidos solúveis), as quais foram separadas por três  
167 repetições. Para as demais análises do estudo (atividade antioxidante por meios dos radicais DPPH e  
168 ABTS, antocianinas monoméricas totais e individuais, compostos fenólicos totais e flavonoides  
169 totais) separou-se 200 g de amostra por repetição, as quais foram acondicionadas em embalagens de

170 polietileno (0,10 micra), armazenadas em ultrafreezer, posteriormente liofilizadas em liofilizador  
171 (Liobrás - L101) e acondicionadas em tubos Falcon com capacidade de 45 mL.

172 O delineamento experimental foi realizado a partir de 13 amostras, contendo 3 repetições em cada  
173 amostra, totalizando em 39 amostras x 10 protocolos de análise = 390 determinações x 3 repetições  
174 = 1.170 determinações.

175

### 176 *2.3 Determinação instrumental da cor*

177 Para a determinação instrumental da cor utilizou-se o colorímetro (CR300, Minolta  
178 Chromamater), através do sistema de cor CIELab. Os parâmetros avaliados foram o  $a^*$  e  $b^*$ , em que  
179 o ângulo de tonalidade  $h$  inicia-se no eixo  $+a^*$  e é dado em graus; 0 seria  $+a^*$  (vermelho), 90 seria  
180  $+b^*$  (amarelo), 180 seria  $-a^*$  (verde) e 270 seria  $-b^*$  (azul). Foi utilizado para calcular o ângulo Hue  
181 a seguinte equação ( $^{\circ}\text{Hue} = \tan^{-1} b^*/a^*$ ), o qual indica a cor observada. Os ensaios foram realizados  
182 com três repetições, e em cada repetição utilizaram-se três frutos.

### 183 *2.4 pH e acidez titulável*

184 O pH foi determinado a partir 1 g de amostra previamente macerada em béquer de 100 mL,  
185 adicionado 40 mL de água destilada, posteriormente agitou-se o conteúdo até as partículas ficarem  
186 uniformemente suspensas e após determinou-se o pH por potenciometria, em pHmetro (K392014B,  
187 Kasvi®). Para avaliação da acidez titulável (AT), utilizou-se o método volumétrico com NaOH 0,1  
188 M, pesou-se 1 g de amostra e adicionou-se 40 mL de água destilada, agitou-se e foi observado o pH  
189 da amostra. Após procedeu-se a titulação da amostra até alcançar pH 8,2. Foram realizadas três  
190 repetições para cada variável e os resultados foram expressos em mg de ácido málico por 100 g de  
191 amostra em massa úmida (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

192

193

194

195

## 196 2.5 Sólidos solúveis

197 O teor de sólidos solúveis (SS) foi determinado de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (2008), a  
198 20 °C, utilizando-se 1 gota de suco puro no refratômetro digital (PR-32α, Atago®), sendo os  
199 resultados expressos em °Brix. Os ensaios foram realizados com três repetições.

## 200 2.6 Relação SS/AT

201 Determinada pela razão entre os dois constituintes (sólidos solúveis e acidez titulável).

## 202 2.7 Preparação dos extratos para as análises de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e 203 atividade antioxidante

204 Para a preparação dos extratos, pesaram-se 200 mg de amostra liofilizada em tubos Falcon de 15  
205 mL, após foi adicionado 10 mL de metanol P.A, posteriormente homogeneizou-se em agitador de  
206 tubos por 1 min cada amostra e foram centrifugadas (Centrifuge RC5C, Sorvall Instruments) a 7000  
207 rpm durante 15 min (15 °C). Logo após, foi coletado o sobrenadante em tubos Falcon de 15 mL e  
208 armazenou-se em freezer a -20 °C até o momento da realização das análises.

## 209 2.8 Atividade antioxidante pela captura do radical DPPH

210 Para a determinar o potencial antioxidante seguiu-se o método de Brand-Williams et al. (1995),  
211 adaptado, utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Preparou-se uma solução  
212 estoque de DPPH (24 mg de DPPH em 100 mL de metanol). Posteriormente, uma solução de uso foi  
213 preparada, adicionando 10 mL da solução estoque em 45 mL de metanol P.A. A quantificação foi  
214 realizada em microplaca contendo 96 poços. Ajustou-se a absorbância a 515 nm da solução de  
215 trabalho de DPPH para  $1,1 \pm 0,02$ . Para a reação, utilizou-se 20 µL do extrato preparado e 280 µL  
216 da solução de uso. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 515 nm em  
217 espectrofotômetro (6705 UV/Vis; Jenway®). Utilizou-se como branco o metanol. Os ensaios foram  
218 realizados com três repetições. O conteúdo antioxidante foi expresso como equivalentes de trolox  
219 ( $\mu\text{mol Eq Trolox } 100\text{g}^{-1}$ ), em amostras de massa seca, de acordo com a equação linear da curva

220 analítica de trolox (em concentrações de 10 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A equação da curva analítica foi  
221  $y=0,0045x + 0,0031$ ,  $R^2= 0,9948$ , em que "y" é a absorbância e "x" é a concentração como  
222 equivalentes de trolox.

### 223 *2.9 Atividade antioxidante pela captura do radical livre ABTS*

224 A capacidade antioxidante foi determinada de acordo com método descrito por Re et al. (1999),  
225 por meio da captura do radical 2,2-azino-bis(3 etilbezotiazolina)-6-ácido sulfônico. Elaborou-se uma  
226 solução estoque de ABTS (192 mg de ABTS em 50 mL de água destilada). Após, foi preparada a  
227 solução de persulfato de potássio, adicionando 378,4 mg de persulfato de potássio em água destilada  
228 até completar o volume para 10 mL em um balão volumétrico. Posteriormente, preparou-se uma  
229 solução de uso, adicionando 5 mL da solução estoque e 88  $\mu\text{L}$  da solução de persulfato de potássio.  
230 A quantificação foi realizada em microplaca contendo 96 poços. Ajustou-se a absorbância a 734 nm  
231 da solução de trabalho de ABTS para  $0,70 \text{ nm} \pm 0,05$ . Para a reação, utilizou-se 20  $\mu\text{L}$  do extrato  
232 preparado e 280  $\mu\text{L}$  da solução de uso. As amostras foram agitadas em vórtex durante 30 s e em  
233 seguida deixou-se reagir durante 30 min no escuro e em temperatura ambiente. Utilizou-se como  
234 branco o etanol. Os ensaios foram realizados com três repetições. A quantificação do conteúdo  
235 antioxidante foi expressa como equivalentes de trolox ( $\mu\text{mol Eq Trolox } 100\text{g}^{-1}$ ), em amostras de  
236 massa seca, de acordo com a equação linear da curva analítica de trolox (em concentrações de 10 a  
237  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A equação da curva analítica foi  $y=0,0061x + 0,0176$ ,  $R^2= 0,9923$ , em que "y" é a  
238 absorbância e "x" é a concentração como equivalentes de trolox.

### 239 *2.10 Compostos fenólicos totais*

240 O conteúdo de compostos fenólicos totais, foi determinado segundo Singleton e Rossi (1965).  
241 Para extração foram pesadas 200 mg de amostra, as quais foram diluídas em 20 mL de metanol P.A.  
242 e agitadas em Ultra-turax (T18, IKA) a 12.000 rpm, durante 1 min. Posteriormente, o extrato foi  
243 centrifugado (Centrifuge RC5C, Sorvall Instruments) por 15 min a 6.000 rpm. O sobrenadante foi  
244 recolhido para novos tubos Falcon e armazenado em freezer a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para a reação, adicionou-se 15

245  $\mu\text{L}$  do extrato, 240  $\mu\text{L}$  de água destilada, 15  $\mu\text{L}$  de Folin Ciocalteau 0,25 N, posteriormente agitou-  
246 se em vórtex por 10 s e deixou-se no escuro durante 3 min para que ocorresse a reação. Após,  
247 adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 N e deixou-se por 2 h no escuro. Os ensaios foram realizados com  
248 três repetições. A quantificação foi realizada em microplaca contendo 96 poços. Realizou-se a leitura  
249 das amostras em espectrofotômetro (6705 UV/Vis; Jenway®) no comprimento de onda de 725 nm.  
250 O conteúdo fenólico foi expresso como equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  ácido gálico), em  
251 amostras de massa seca, de acordo com a equação linear da curva analítica de ácido gálico (em  
252 concentrações de 10 a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A equação da curva analítica foi  $y=0,0045x + 0,0715$ ,  $R^2= 0,998$ ,  
253 em que "y" é a absorbância e "x" é a concentração como equivalentes de ácido gálico.

#### 254 2.11 *Flavonoides totais*

255 O conteúdo de flavonoides totais foi determinado pelo método proposto por Zhishen et al. (1999).  
256 A quantificação foi realizada em microplaca contendo 96 poços. Para a reação, adicionou-se 30  $\mu\text{L}$   
257 do extrato, 120  $\mu\text{L}$  de água destilada e agitou-se em vórtex por 10s. Após, foi adicionado 9  $\mu\text{L}$  de  
258  $\text{NaCO}_2$  10% (m/v), agitou-se novamente durante 10 s e aguardou-se 5 min para que ocorresse a  
259 reação. Posteriormente, adicionou-se 9  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  20% (m/v), a solução foi agitada em vórtex por  
260 10 s e aguardou-se 6 min para a reação. Em seguida, foi acrescentado 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1 M e 72  $\mu\text{L}$   
261 de água destilada. Os ensaios foram realizados com três repetições. Realizou-se a leitura das amostras  
262 em espectrofotômetro no comprimento de onda de 510 nm. O conteúdo de flavonoides foi expresso  
263 como equivalentes de catequina (catequina  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ ), em amostras de massa seca, de acordo com a  
264 equação linear da curva analítica de catequina (em concentrações de 10 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A equação  
265 da curva analítica foi  $y=0,0024x + 0,0064$ ,  $R^2= 0,9969$ , em que "y" é a absorbância e "x" é a  
266 concentração como equivalentes de catequina.

#### 267 2.12 *Antocianinas monoméricas totais*

268 Para a quantificação das antocianinas totais seguiu-se o método proposto por Lee e Francis (1972),  
269 onde 950  $\mu\text{L}$  de etanol acidificado a pH 1.0 foram adicionados a 50  $\mu\text{L}$  de amostra. A solução foi

270 agitada em vortex durante 1 min, a cada 15 min, por uma hora, sendo então centrifugada (Centrifuge  
271 RC5C, Sorvall Instruments) por 15 min a 5.000 rpm, a 5 °C. O processo foi realizado em tubos Falcon  
272 envolvidos com papel alumínio para evitar o contato com a luz. A reação foi realizada em microplaca  
273 contendo 96 poços. Os ensaios foram realizados com três repetições. Após a centrifugação, realizou-  
274 se a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro com comprimento de onda de 520 nm. O conteúdo  
275 de antocianinas totais foi expresso como equivalentes de pelargonidina ( $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  pelargonidina),  
276 em amostras de massa seca, de acordo com a equação linear da curva analítica de pelargonidina (em  
277 concentrações de 2,50 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A equação da curva analítica foi  $y=0,0782x + 0,0494$ ,  $R^2=$   
278 0,9998 onde "y" é a absorbância e "x" é a concentração como equivalentes de pelargonidina.

## 279 2.13 *Análise cromatográfica de antocianinas individuais por HPLC-MS*

### 280 2.13.1 *Preparação dos extratos*

281 Para a determinação das antocianinas individuais, utilizou-se 10 g de fruto, posteriormente  
282 triturados e misturados com 15 mL de uma solução de metanol/TFA 2% em água (10:90, v/v) e  
283 homogeneizadas por um Ultra-Turrax 9.900 x g (IKA-Werke, Staufen, D) por 1 min. O homogenato  
284 foi extraído durante 30 min sob agitação no escuro à temperatura ambiente. A suspensão foi  
285 centrifugada a  $1.000\times g$  por 10 min a 4 °C, e o sobrenadante foi recuperado. O resíduo foi extraído  
286 novamente até o desaparecimento da cor vermelha ( $4 \times 15$  mL) com uma solução de metanol/TFA  
287 2% em água (10:90, v/v) e tratado como descrito acima. Os sobrenadantes foram reunidos e o volume  
288 foi ajustado para 200 mL por solução de TFA a 2% em água, conforme método proposto por  
289 Siebeneichler et al. (2020).

### 290 2.13.2 *Instrumentação e condições analíticas*

291 Para a injeção, 100  $\mu\text{L}$  desse extrato foram diluídos em 800  $\mu\text{L}$  de metanol grau HPLC (Sigma-  
292 Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e a seguir filtrados através de uma membrana de 0,45  $\mu\text{M}$ . Com a  
293 amostra pronta, 10  $\mu\text{L}$  dela foram injetados em um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência  
294 (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução do tipo

295 quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para a separação  
296 cromatográfica, foram utilizadas a pré-coluna C18 (2,0 x 4,0 mm) e a coluna C18 Luna (2,0 x 150  
297 mm, 100 Å, 3,0 µm) (Phenomenex Torrance, CA, EUA). O processo de separação foi realizado com  
298 a utilização de duas fases móveis (eluentes) para promover a interação com as amostras e consequente  
299 realizar a separação cromatográfica. As fases móveis foram: água com 0,1% de ácido fórmico  
300 (eluento A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (eluento B). O processo de separação durou 30  
301 minutos para cada amostra e os gradientes de eluição utilizados foram: 0–2 min, 10% B; 2–15 min,  
302 10–75% B; 15-18 min, 90% B; 18-21 min 90% B; 21-23 min, 10% B e 23-30 min, 10% B. Um fluxo  
303 de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura da coluna de 40 °C foram mantidos constantes. O espectrômetro de  
304 massa foi operado em modo ESI positivo (antocianinas), tendo coletado espectros em uma faixa de  
305 massa de m/z 50 a 1200, com voltagem capilar em 3,5 kV, pressão de gás de nebulização (N<sub>2</sub>) a 2  
306 bar, gás de secagem a 8 L.min<sup>-1</sup>, temperatura da fonte a 180 °C, colisão de RF a 150 Vpp, transferência  
307 a 70 mS e armazenamento de pré-pulso a 5 mS. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio  
308 10mM, cobrindo a faixa de aquisição de m/z 50 até 1200. Experimentos automáticos de MS/MS  
309 foram realizados ajustando os valores de energia de colisão como se segue: m/z 100, 15 eV; m/z 500,  
310 35 eV; m/z 1000, 50 eV, usando nitrogênio como gás de colisão. Os dados de MS e MS/MS foram  
311 processados por meio do software Data analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As  
312 antocianinas foram caracterizadas pelo espectro de UV/Vis (210-800 nm) e massa exata, padrões de  
313 fragmentação MS<sub>n</sub> em comparação com os dados da biblioteca do equipamento, massas de dados  
314 (padrões, Metlin, Mass Bank, Kegg Compound, Chem Spider), curva padrão de malvidina 3-O-  
315 galactosideo, e em comparação com padrão isotópico (Siebeneichler et al., 2020).

#### 316 2.14 *Análise estatística*

317 A análise estatística foi realizada utilizando o programa o programa R (Core Team, 2019). Os  
318 dados foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias  
319 (teste Tukey), tomando como massa os níveis de significância maiores que 95% ( $p \leq 0,05$ ). Além

320 disso, para calcular o coeficiente de correlação entre os resultados, aplicou-se o teste de correlação  
321 de Person.

### 322 **3. Resultados e discussão**

#### 323 *3.1 pH, acidez titulável, sólidos solúveis, relação SS/AT e determinação instrumental da cor*

324 Os mirtilos se caracterizaram como frutos ácidos, com pH variando de 3,23 a 3,76 e acidez total  
325 variando de 0,23 a 0,73 (Tabela 1). O genótipo PW1 se diferenciou por apresentar o maior pH (3,76)  
326 e a menor acidez (0,23 mg 100g<sup>-1</sup> de ácido málico). Os resultados atribuídos ao genótipo do presente  
327 estudo, ocorreram conforme o previsto, pois o mesmo apresenta características únicas, e o alto valor  
328 de pH encontrado, assim como a menor acidez, se justifica pelas diferenças genéticas existentes nessa  
329 planta, as quais interferem nos parâmetros de qualidade dos frutos (Spinardi et al. 2019).

330 Similarmente, os mirtilos são caracterizados por apresentarem teores relativamente altos de  
331 sólidos solúveis, os quais no presente estudo variaram de 13,33 a 16,89 °Brix. A cultivar com maior  
332 teor foi Climax e o de menor teor foi o genótipo PW1. Assim, ao comparar esse resultado com outros  
333 estudos, observa-se que ‘Climax’ também ganhou destaque em relação aos sólidos solúveis em  
334 relação a outras cultivares pertencentes ao grupo rabbiteye (Pertuzatti, 2009; Radünz et al., 2014).  
335 Possivelmente, o alto teor encontrado por ‘Climax’ possa ser justificado pelas condições climáticas  
336 da cidade de Pelotas (RS), pois durante o ciclo 2019/20 houve baixa precipitação pluvial, conforme  
337 os dados apresentados pela Embrapa (2019), e com isso, pode ocorrer maior concentração dos sólidos  
338 solúveis nas bagas.

339 Com relação a variável SS/AT, se obteve grande variação entre os valores (4,56 a 16,83), onde o  
340 genótipo PW1 apresentou valor superior e a cultivar Briteblue conferiu menor valor na razão entre os  
341 dois constituintes, a qual é essencial, pois representa o equilíbrio entre os açúcares e ácidos, além de  
342 estar relacionada ao índice de maturação e ser fundamental para a contribuição do sabor dos frutos  
343 (Almutairi et al., 2017). Os parâmetros físico-químicos apresentados são ideais para os pequenos  
344 frutos, pois os mirtilos devem apresentar teor de SS superior a 10 °Brix, pH entre 2,25 e 4,25, AT

345 entre 0,3 e 1,3 mg 100g<sup>-1</sup> e a relação SS/AT entre 10 e 33 (Saftner et al., 2008), e esses resultados  
346 foram obtidos na grande maioria das amostras do presente estudo, sugerindo assim, que os frutos  
347 avaliados apresentam boa qualidade.

348 Por fim, a coloração foi similar para todos os frutos, não se obtendo diferenças significativas entre  
349 as cultivares e genótipos, pois todos estavam com estágio completo de maturação, caracterizado pela  
350 coloração azul-escura dos frutos. Assim sendo um parâmetro físico fundamental, pois é responsável  
351 pela classificação do estágio de maturação dos frutos, a qual é uma característica importante para a  
352 comercialização, além de estar diretamente relacionada com o conteúdo de antocianinas (Lobos et  
353 al., 2018).

### 354 *3.2 Compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas totais*

355 Em relação aos compostos fenólicos totais, os mirtilos apresentaram excelentes quantidades  
356 desses compostos fitoquímicos, como o previsto e, os teores oscilaram entre 5,00 a 5,87 mg 100g<sup>-1</sup>  
357 de ácido gálico, com destaque para o genótipo PW1 e para a maioria das amostras, as quais foram  
358 significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ), com exceção do genótipo BB4, o qual conferiu menor teor  
359 de fenólicos (Tabela 2). Outros autores, ao trabalharem com seleções e cultivares de mirtilheiro  
360 provenientes do grupo rabbiteye, verificaram valores similares para fenólicos totais (Vizzotto et al.,  
361 2013). Entretanto, se observou em outras pesquisas, com cultivares pertencentes ao grupo highbush,  
362 menor teor de fitoquímicos em comparação ao grupo rabbiteye (Akšić et al., 2019; Gündüz et al.,  
363 2015), sendo portanto, os dados apresentados acima fundamentais para os produtores de mirtilo da  
364 região Sul do Brasil, pois as cultivares do grupo rabbiteye se adaptam bem em regiões com poucas  
365 horas de frio, e como foi visto, seus frutos apresentam superioridade quanto ao teor de compostos  
366 fenólicos.

367 Todavia para flavonoides totais, os teores variaram entre 5,80 a 10,31 mg 100g<sup>-1</sup> de catequina, se  
368 obtendo valores estatisticamente semelhantes em grande parte das cultivares e genótipos ( $p \leq 0,05$ ), já  
369 o menor valor foi verificado pelo genótipo BB4. Isto ocorreu, possivelmente, porque os genitores  
370 utilizados nos cruzamentos dessas seleções, apresentam divergências químicas estruturais

371 relacionadas diretamente a concentração dos compostos fenólicos e flavonoides, especificamente na  
372 configuração e no número de hidroxilas presentes, e assim, ocorre uma variabilidade no teor dos  
373 mesmos (Cao et al., 1997). No entanto, a oscilação desses compostos também dependerá de alguns  
374 fatores agronômicos relacionados principalmente as condições de solo e manejo, como a adubação,  
375 posição solar, poda e irrigação das plantas da área de plantio (Correia et al., 2016; Skrovankova et  
376 al., 2015).

377 Ao quantificar as antocianinas totais, foi possível encontrar quantidade elevada deste composto  
378 tanto nas cultivares quanto nos genótipos avaliados, como o esperado, pois são os principais  
379 polifenóis encontrados nos mirtilos e possivelmente esse grupo de fitoquímicos seja responsável por  
380 conferir inúmeros benefícios a saúde humana (Del Rio et al., 2010; Kaume et al., 2012; Stevenson e  
381 Scalzo, 2012). Dessa forma, no presente estudo, os teores de antocianinas diferiram entre 6,14 a 11,71  
382 mg 100g<sup>-1</sup> de pelargonidina, com ênfase para o genótipo PW5, apresentando maior valor e os menores  
383 valores foram obtidos por 'Bluebelle' e pelo genótipo PW2 (Tabela 2). O destaque obtido no genótipo  
384 PW5, possivelmente ocorreu em virtude do seu possível genitor ser 'Climax', o qual estatisticamente  
385 ( $p \leq 0,05$ ) também conferiu conteúdo elevado de antocianinas (10,11 mg 100g<sup>-1</sup> de pelargonidina) e  
386 também por ser uma seleção com características genéticas únicas e, isso, pode favorecer o acúmulo  
387 desse pigmento (Spinardi et al., 2019; Wang et al., 2012).

### 388 3.3 Atividade antioxidante

389 Os teores da atividade antioxidante por meio do DPPH nos frutos de mirtilo apresentaram  
390 variações entre 3,27 a 6,65  $\mu\text{Mol Trolox } 100\text{g}^{-1}$ , conferindo superioridade o genótipo PW1 e a cultivar  
391 'Bluegem'. Porém, ao utilizar o protocolo ABTS, os conteúdos antioxidantes encontraram-se na faixa  
392 entre 28,31 a 46,23  $\mu\text{Mol Trolox } 100\text{g}^{-1}$ , com destaque estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) para  
393 'Bluegem', 'Delite', 'Woodard' e genótipo BB3 (Tabela 3). Diante disso, o alto potencial  
394 antioxidante verificado pelos mirtilos do presente estudo se deve principalmente, a ampla variedade  
395 de compostos fenólicos em sua composição, os quais são considerados excelentes antioxidantes *in*  
396 *vitro*, responsáveis por diversos potenciais benéficos à saúde humana em virtude de sua capacidade

397 antioxidante (Pertuzatti et al., 2016; Stevenson e Scalzo, 2012) e, como visto anteriormente, os  
398 genótipos e as cultivares avaliadas apresentaram elevada quantidade de fenólicos totais,  
399 essencialmente o genótipo PW1 e, por este motivo possivelmente possa ter se destacado.

400 Evidencia-se ainda neste estudo, que o genótipo BB4 apresentou menor teor de antioxidantes nos  
401 dois protocolos utilizados (3,27 e 28,31  $\mu\text{Mol Trolox } 100\text{g}^{-1}$ ). Assim, sugere-se que esse resultado  
402 pode ter ocorrido em virtude do referido genótipo BB4 ser proveniente de sementes da ‘Bluebelle’, e  
403 a mesma não conferiu superioridade em relação a atividade antioxidante tanto pelo DPPH quanto  
404 pelo ABTS.

405 No entanto, alguns autores ressaltam que a capacidade antioxidante dos mirtilos podem ser  
406 alteradas por inúmeros fatores, incluindo genótipo, região de cultivo, estágio de maturação e  
407 condições de armazenamento pós-colheita (Connor et al., 2002; Prior et al., 1998; Spinardi et al.,  
408 2019; Zhang et al., 2020).

#### 409 *3.4 Antocianinas individuais por HPLC-MS*

410 No presente estudo, foram identificadas cinco antocianinas oriundas de três grupos de  
411 antocianidinas (cianidina, malvidina e delphinidina) (Tabela 4). Ao quantificar o conteúdo de  
412 malvidina-3-O-glicosídeo, os teores diferiram entre 18,33 a 63,00  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  de pelargonidina, onde  
413 ‘Bluebelle’ e ‘Bluegem’ conferiram estatisticamente maior valor ( $p \leq 0,05$ ) e ‘Climax’ com menor  
414 valor. Em relação a malvidina-3-O-galactosídeo, não houve diferença significativa entre as cultivares,  
415 sugerindo que as mesmas apresentaram conteúdo elevado dessa antocianidina.

416 Da mesma forma, para cianidina-3-O-glicosídeo, os valores oscilaram entre 12,00 a 22,33  $\text{mg}$   
417  $100\text{g}^{-1}$  de malvidina, evidenciando ‘Briteblue’, ‘Climax’ e ‘Delite’ com valores significativamente  
418 superiores ( $p \leq 0,05$ ) em relação as demais cultivares. Simultaneamente, ao analisar o conteúdo de  
419 cianidina-3-O-galactosídeo os valores diferiram entre 13,67 a 71,67  $100\text{g}^{-1}$  de malvidina, onde  
420 ‘Briteblue’ e ‘Climax’ se destacaram com os maiores valores.

421 Todavia para delphinidina-3-O-galactosídeo, os valores obtidos estão entre 9,33 e 34,67  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$   
422 <sup>1</sup> de malvidina, inferindo que ‘Briteblue’ e ‘Climax’ apresentaram elevado conteúdo dessa

423 antocianidina. Sendo as principais antocianinas encontradas em cultivares do rabbiteye e highbush,  
424 pertencentes a 20 glicosídeos não acilados, ou seja, o galactosídeo, glicosídeo, arabinósido e  
425 xilosídeo, de cinco principais antocianidinas, incluindo a delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina  
426 e malvidina (Lohachoompol et al., 2008; Sun et al., 2012; Yousef et al., 2013). Nesse sentido, foram  
427 encontrados nos frutos de mirtilo do presente estudo, a malvidina, seguido pela cianidina e delfinidina  
428 com maior predominância, igualmente verificado por outro estudo, os quais sugeriram que em  
429 cultivares provenientes do grupo rabbiteye houve prevalência de antocianidinas do anel B não  
430 metoxiladas, como a delfinidina, cianidina e malvidina (Pertuzatti et al., 2016).

431 Entretanto, os resultados obtidos pelas cultivares conferem variações na quantidade de  
432 antocianinais pelas diferenças genéticas existentes, bem como pelo grau de maturação e tamanho dos  
433 frutos, como observado por inúmeros estudos (Gao e Mazza, 1994; Moyer et al., 2002; Scalzo et al.,  
434 2013; Wang et al., 2012; Yousef et al., 2013).

### 435 *3.5 Correlação de Pearson entre as variáveis pH, AT, SS, relação SS/AT, °Hue, DPPH, ABTS,* 436 *Fenólicos Totais, Flavonoides Totais e Antocianinas Totais*

437 A partir dos valores encontrados na análise de correlação de Pearson entre as variáveis, houve  
438 correlação negativa entre AT e pH ( $r = -0,66$ ), sugerindo que a medida que a acidez dos frutos  
439 aumentou, o pH diminuiu (Tabela 5). Foi possível encontrar resultados semelhantes em outro estudo,  
440 em que verificaram a mesma correlação para as variáveis AT e pH (Güdünz et al., 2015).

441 Também ocorreu correlação negativa ( $r = -0,44$ ) entre as variáveis SS e pH. Entretanto, os  
442 resultados achados em outro estudo divergiram, pois os autores identificaram correlação positiva  
443 entre SS e pH ( $r = 0,7$ ) ao trabalharem com as mesmas cultivares de mirtilo (Pertuzatti, 2009). Essas  
444 divergências encontradas nas pesquisas podem estar associadas possivelmente a presença elevada dos  
445 ácidos orgânicos nas cultivares/genótipos de mirtilo, compostos principalmente pelos ácidos  
446 málico e cítrico, os quais também fazem parte dos sólidos solúveis (Moraes, 2006), e à medida que  
447 estes aumentam, o pH conseqüentemente diminui.

448 Ao correlacionar as variáveis SS e AT, se obteve correlação positiva ( $r= 0,50$ ). Sugere-se que essa  
449 associação pode ter ocorrido em virtude do sabor doce-ácido presente nos frutos, existindo equilíbrio  
450 entre esses dois constituintes, não ocorrendo predominância de apenas um elemento (Fachinello,  
451 2008). Nesse sentido, as duas variáveis aumentaram. Porém, foi possível identificar em outro estudo,  
452 correlação negativa entre as variáveis SS e AT, inferindo que o resultado obtido no presente estudo,  
453 possivelmente possa ter ocorrido pelo sabor característico do mirtilo, assim como pelas diferenças  
454 genéticas, de clima e de solo existentes (Scalzo et al., 2015).

455 Diante das variáveis SS/AT e AT, houve associação negativa ( $r= -0,89$ ). Similarmente, ocorreu a  
456 mesma correlação para SS/AT e SS ( $r= -0,54$ ). Todavia, SS/AT e pH se correlacionaram  
457 positivamente ( $r= 0,77$ ).

458 Em relação ao DPPH e pH, se obteve correlação positiva ( $r= 0,38$ ), podendo esse resultado ser  
459 justificado pelo método do DPPH ser influenciado pelo solvente, bem como pelo pH das reações.  
460 Assim, possivelmente por este motivo possa ter ocorrido a correlação entre as variáveis (De Oliveira  
461 et al., 2009).

462 Os métodos antioxidantes utilizados no estudo (ABTS e DPPH) foram altamente correlacionados  
463 ( $r= 0,65$ ), e partir desses resultados se fundamenta a proporcionalidade entre os dois métodos  
464 utilizados para a quantificação. Dados semelhantes foram identificados em outro estudo, onde  
465 semelhantemente se encontrou correlação entre o ABTS e o DPPH (Gonçalves, 2015).

466 Os compostos fenólicos, flavonoides e as antocianinas totais se correlacionaram positivamente  
467 ao DPPH e ABTS, pois a medida que o teor desses compostos aumentou, os antioxidantes também  
468 foram elevados, indicando que nos frutos estudados a atividade antioxidante se deve, principalmente,  
469 a presença dos fenólicos, flavonoides e das antocianinas. Igualmente, se obteve correlação positiva  
470 entre a atividade antioxidante e o conteúdo de antocianinas e com os compostos fenólicos totais ( $r=$   
471  $0,61$  e  $0,89$ , respectivamente) em trabalho desenvolvido por Wang et al. (2012). Outros autores  
472 também verificaram alta correlação entre fenólicos totais com antioxidantes e com antocianinas totais

473 ao trabalharem com a mesma cultura ( $r= 0,85$  e  $0,80$  respectivamente) (Medeiros et al., 2017; Scalzo  
474 et al., 2015)

475 Além disso, houve correlação positiva entre flavonoides totais e fenólicos totais ( $r= 0,47$ ), o que  
476 já era esperado, pois esses compostos estão relacionados entre si, uma vez que os flavonoides  
477 pertencerem a uma classe dos compostos fenólicos (Koirala et al., 2016).

478 Por fim, foi encontrado neste estudo correlação negativa ( $r= -0,33$ ) entre flavonoides totais e °Hue.  
479 No entanto, essa correlação pode ser atribuída ao conteúdo de antocianinas totais, a qual não foi  
480 significativa ao ser correlacionada com flavonoides totais e com o °Hue.

#### 481 **4. Conclusões**

482 Foram identificados genótipos e cultivares de mirtilheiro pertencentes ao grupo rabbiteye com alto  
483 potencial funcional, se destacando os genótipos PW1, PW2, PW5, BB3 e as cultivares Bluegem,  
484 Briteblue, Climax, Delite, os quais conferiram elevada composição fenólica e atividade antioxidante,  
485 possivelmente pelas características genéticas únicas presentes em suas estruturas. Assim, os  
486 genótipos são considerados tão promissores para a indústria alimentícia e também para o consumo *in*  
487 *natura* quanto as cultivares comerciais já consolidadas no mercado da fruticultura, tendo em vista a  
488 riqueza fitoquímica presente neste pequeno fruto.

#### 489 **Declaração de contribuição de autoria CRediT**

490 **Amanda Radmann Bergmann:** Conceituação, Análise formal, Investigação, Escrita - rascunho  
491 original, Visualização. **Tatiane Jéssica Siebeneichler:** Metodologia, Análise formal, Investigação.  
492 Redação – revisão. **Lucas de Oliveira Fischer:** Investigação, Análise formal. **César Valmor**  
493 **Rombaldi:** Redação – revisão, Análise formal, Aquisição de financiamento. **Doralice Lobato de**  
494 **Oliveira Fischer:** Redação - revisão, Supervisão, Conceituação. **Catia Silveira da Silva:**  
495 Investigação. **Igor Ratzmann Holz:** Investigação. **Elizabete Helbig:** Redação - revisão,  
496 Conceituação, Supervisão, Aquisição de financiamento.

#### 497 **Declaração de Interesses**

498 Os autores declaram não haver conflito de interesses.

#### 499 **Agradecimentos**

500 Os autores agradecem à Universidade Federal de Pelotas e à Faculdade de Nutrição pela  
501 oportunidade de realização do mestrado acadêmico e, em especial, ao Departamento de Ciência e

502 Tecnologia Agroindustrial (DCTA), da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), que  
503 viabilizou a realização deste estudo.

#### 504 **Referências**

- 505 Agrometeorology, 2019. Monthly Climatological Normals for the 1971/2000 Period [WWW  
506 Document]. Agrometeorol. » Climate Pelotas. URL  
507 <https://wp.ufpel.edu.br/agrometeorologia/informacoes/clima-de-pelotas/> (accessed 4.16.21).
- 508 Akšić, M.F., Zagorac, D.D., Sredojević, M., Milivojević, J., Gašić, U., Meland, M., Natić, M.,  
509 2019. Chemometric characterization of strawberries and blueberries according to their  
510 phenolic profile: Combined effect of cultivar and cultivation system. *Molecules* 24, 1–25.  
511 <https://doi.org/10.3390/molecules24234310>
- 512 Almutairi, K.F., Bryla, D.R., Strik, B.C., 2017. Potential of deficit irrigation, irrigation cutoffs, and  
513 crop thinning to maintain yield and fruit quality with less water in northern highbush  
514 blueberry. *HortScience* 52, 625–633. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11533-16>
- 515 Bell, L., Lamport, D.J., Butler, L.T., Williams, C.M., 2017. A study of glycaemic effects following  
516 acute anthocyanin-rich blueberry supplementation in healthy young adults. *Food Funct.* 8,  
517 3104–3110. <https://doi.org/10.1039/c7fo00724h>
- 518 Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate  
519 antioxidant activity. *Leb. Technol.* 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- 520 Cantuarias-Avilés, T., Da Silva, S.R., Medina, R.B., Moraes, A.F.G., Alberti, M.F., 2014. Cultivo  
521 do mirtilo: Atualizações e desempenho inicial de variedades de baixa exigência em frio no  
522 estado de São Paulo. *Rev. Bras. Frutic.* 36, 139–147. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-453/13>
- 524 Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-  
525 activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 749–760. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00351-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00351-6)
- 527 Connor, A.M., Luby, J.J., Tong, C.B.S., Finn, C.E., Hancock, J.F., 2002. Genotypic and  
528 environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content  
529 among blueberry cultivars. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127, 89–97.  
530 <https://doi.org/10.21273/jashs.127.1.89>
- 531 Core Team, R., 2019. A language and environment for statistical computing. [WWW Document]. R  
532 Found. Stat. Comput. URL <http://www.r-project.org/>

- 533 Correia, S., Gonçalves, B., Aires, A., Silva, A., Ferreira, L., Carvalho, R., Fernandes, H., Freitas,  
534 C., Carnide, V., Paula Silva, A., 2016. Effect of Harvest Year and Altitude on Nutritional and  
535 Biometric Characteristics of Blueberry Cultivars. *J. Chem.* 2016, 1–12.  
536 <https://doi.org/10.1155/2016/8648609>
- 537 De Oliveira, A.C., Valentim, I.B., Goulart, M.O.F., Silva, C.A., Bechara, E.J.H., Trevisan, M.T.S.,  
538 2009. Vegetals as natural sources of antioxidants. *Quim. Nova* 32, 689–702.  
539 <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000300013>
- 540 Debnath-Canning, M., Unruh, S., Vyas, P., Daneshtalab, N., Igamberdiev, A.U., Weber, J.T., 2020.  
541 Fruits and leaves from wild blueberry plants contain diverse polyphenols and decrease  
542 neuroinflammatory responses in microglia. *J. Funct. Foods* 68, 1–8.  
543 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103906>
- 544 Del Rio, D., Borges, G., Crozier, A., 2010. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and  
545 evidence of protective effects. *Br. J. Nutr.* 104, 67–90.  
546 <https://doi.org/10.1017/S0007114510003958>
- 547 Embrapa, 2019. Dados meteorológicos de Pelotas/RS em tempo real [WWW Document].  
548 Estatísticas resumos Mens. URL [http://agromet.cpact.embrapa.br/online/Current\\_Monitor.htm](http://agromet.cpact.embrapa.br/online/Current_Monitor.htm)  
549 (accessed 6.6.21).
- 550 Fachinello, J.C., 2008. Blueberry. *Rev. Bras. Frutic.* 30, 285–576.
- 551 Figueira, M.-E., Oliveira, M., Direito, R., Rocha, J., Alves, P., Serra, A.-T., Duarte, C., Bronze, R.,  
552 Fernandes, A., Brites, D., Freitas, M., Fernandes, E., Sepodes, B., 2016. Protective effects of a  
553 blueberry extract in acute inflammation and collagen-induced arthritis in the rat. *Biomed.*  
554 *Pharmacother.* 83, 1191–1202. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.040>
- 555 Gallardo, R.K., Zhang, Q., Dossett, M., Polashock, J.J., Rodriguez-Saona, C., Vorsa, N., Edger,  
556 P.P., Ashrafi, H., Babiker, E., Finn, C.E., Iorizzo, M., 2018. Breeding trait priorities of the  
557 blueberry industry in the United States and Canada. *HortScience* 53, 1021–1028.  
558 <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12964-18>
- 559 Gao, L., Mazza, G., 1994. Quantitation and Distribution of Simple and Acylated Anthocyanins and  
560 Other Phenolics in Blueberries. *J. Food Sci.* 59, 1057–1059. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08189.x)  
561 [2621.1994.tb08189.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08189.x)
- 562 Gavrilova, V., Kajdžanoska, M., Gjamovski, V., Stefova, M., 2011. Separation, characterization  
563 and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-

- 564 DAD-ESI-MSn. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4009–4018. <https://doi.org/10.1021/jf104565y>
- 565 Giacalone, M., di Sacco, F., Traupe, I., Topini, R., Forfori, F., Giunta, F., 2011. Antioxidant and  
566 neuroprotective properties of blueberry polyphenols: A critical review. *Nutr. Neurosci.* 14,  
567 119–125. <https://doi.org/10.1179/1476830511Y.0000000007>
- 568 Goldmeyer, B., Penna, N.G., Melo, Â., Da Rosa, C.S., 2014. Physicochemical characteristics and  
569 technological functional properties of fermented blueberry bagasse and its flours. *Rev. Bras.*  
570 *Frutic.* 36, 980–987. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-380/13>
- 571 Gonçalves, C.F., 2015. Evaluation of quality parameters in three blueberry varieties in Biological  
572 and Conventional Production mode. Higher Agricultural School of Viseu.
- 573 Gündüz, K., Serçe, S., Hancock, J.F., 2015. Variation among highbush and rabbiteye cultivars of  
574 blueberry for fruit quality and phytochemical characteristics. *J. Food Compos. Anal.* 38, 69–  
575 79. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.09.007>
- 576 Huang, H., Chen, G., Liao, D., Zhu, Y., Xue, X., 2016. Effects of Berries Consumption on  
577 Cardiovascular Risk Factors: A Meta-analysis with Trial Sequential Analysis of Randomized  
578 Controlled Trials. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep23625>
- 579 Instituto Adolfo Lutz, 2008. Physical-chemical methods for food analysis - 4<sup>a</sup> Edition [WWW  
580 Document]. Inst. Adolfo Lutz.
- 581 Kaume, L., Howard, L.R., Devareddy, L., 2012. The blackberry fruit: A review on its composition  
582 and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *J. Agric. Food Chem.* 60,  
583 5716–5727. <https://doi.org/10.1021/jf203318p>
- 584 Klimis-Zacas, D., Vendrame, S., Kristo, A.S., 2016. Wild blueberries attenuate risk factors of the  
585 metabolic syndrome. *J. Berry Res.* 6, 225–236. <https://doi.org/10.3233/JBR-160136>
- 586 Koirala, N., Thuan, N.H., Ghimire, G.P., Thang, D. Van, Sohng, J.K., 2016. Methylation of  
587 flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological  
588 production. *Enzyme Microb. Technol.* 86, 103–116.  
589 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.02.003>
- 590 Kraujalytė, V., Venskutonis, P.R., Pukalskas, A., Česonienė, L., Daubaras, R., 2015. Antioxidant  
591 properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial  
592 and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*)  
593 genotypes. *Food Chem.* 188, 583–590. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.031>
- 594 Li, D., Li, B., Ma, Y., Sun, X., Lin, Y., Meng, X., 2017. Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids

- 595 contents and the antioxidant capacity of various cultivars of highbush and half-high  
596 blueberries. *J. Food Compos. Anal.* 62, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.03.006>
- 597 Lin, Y., Huang, G., Zhang, Q., Wang, Y., Dia, V.P., Meng, X., 2020. Ripening affects the  
598 physicochemical properties, phytochemicals and antioxidant capacities of two blueberry  
599 cultivars. *Postharvest Biol. Technol.* 162, 1–8.  
600 <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111097>
- 601 Lobos, G.A., Bravo, C., Valdés, M., Graell, J., Lara Ayala, I., Beaudry, R.M., Moggia, C., 2018.  
602 Within-plant variability in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.): maturity at harvest and  
603 position within the canopy influence fruit firmness at harvest and postharvest. *Postharvest*  
604 *Biol. Technol.* 146, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.08.004>
- 605 Lohachoompol, V., Mulholland, M., Szrednicki, G., Craske, J., 2008. Determination of  
606 anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. *Food Chem.* 111,  
607 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.067>
- 608 Martín-Gómez, J., Varo, M.Á., Mérida, J., Serratos, M.P., 2020. Influence of drying processes on  
609 anthocyanin profiles, total phenolic compounds and antioxidant activities of blueberry  
610 (*Vaccinium corymbosum*). *LWT* 120, 108931. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108931>
- 611 McAnulty, L.S., Collier, S.R., Pike, J., Thompson, K.L., McAnulty, S.R., 2019. Time course of  
612 blueberry ingestion on measures of arterial stiffness and blood pressure. *J. Berry Res.* 9, 641–  
613 664. <https://doi.org/10.3233/JBR-190413>
- 614 Medeiros, J.G.S., De Bona, C.M., Cuquel, F.L., Biasi, L.A., 2017. Performance of blueberry  
615 cultivars under mild winter conditions. *Ciência Rural* 47, 1–8. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160795>
- 617 Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R., 2012. Composition of  
618 Sugars, Organic Acids, and Total Phenolics in 25 Wild or Cultivated Berry Species. *J. Food*  
619 *Sci.* 77, 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02896.x>
- 620 Miraghajani, M., Momenyan, S., Arab, A., Hasanpour Dehkordi, A., Symonds, M.E., 2020.  
621 Blueberry and cardiovascular disease risk factors: A systematic review and meta-analysis of  
622 randomized controlled trials. *Complement. Ther. Med.* 53, 1–39.  
623 <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102389>
- 624 Moraes, J.O. de, Pertuzatti, P.B., Corrêa, F.V., Salas-Mellado, M.D.L.M., 2007. Study of blueberry  
625 (*Vaccinium ashei* Reade) in food processing. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 27, 18–22.

- 626 <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000500003>
- 627 Moraes, R.R. de, 2006. Refractometry. Piauí.
- 628 Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C., Frei, B., Wrolstad, R.E., 2002. Anthocyanins, phenolics and  
629 antioxidants capacity in diverse small fruits. *J. Agric. Food Chem.* 50, 519–525.
- 630 Pertuzatti, P.B., 2009. Bioactive compounds in different cultivars of blueberry (*Vaccinium ashei*  
631 Reade). Federal University of Pelotas.
- 632 Pertuzatti, P.B., Barcia, M.T., Gómez-Alonso, S., Godoy, H.T., Hermosin-Gutierrez, I., 2021.  
633 Phenolics profiling by HPLC-DAD-ESI-MSn aided by principal component analysis to  
634 classify Rabbiteye and Highbush blueberries. *Food Chem.* 340, 1–10.  
635 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127958>
- 636 Pertuzatti, P.B., Barcia, M.T., Rebello, L.P.G., Gómez-Alonso, S., Duarte, R.M.T., Duarte, M.C.T.,  
637 Godoy, H.T., Hermosín-Gutiérrez, I., 2016. Antimicrobial activity and differentiation of  
638 anthocyanin profiles of rabbiteye and highbush blueberries using HPLC–DAD–ESI-MS n and  
639 multivariate analysis. *J. Funct. Foods* 26, 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.07.026>
- 640 Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M.,  
641 Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C.M., 1998. Antioxidant Capacity as Influenced by Total  
642 Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *J. Agric.*  
643 *Food Chem.* 46, 2686–2693. <https://doi.org/10.1021/jf980145d>
- 644 Radünz, A.L., Acunha, T. dos S., Kröning, D.P., Scheunemann, L.C., Rassch, C.G., Chaves, F.C.,  
645 Herter, F.G., 2014. Effect of pruning time on blueberry fruit yield and quality. *Bragantia* 73,  
646 45–49. <https://doi.org/10.1590/brag.2014.009>
- 647 Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant  
648 activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*  
649 26, 1231–1237.
- 650 Saftner, R., Polashock, J., Ehlenfeldt, M., Vinyard, B., 2008. Instrumental and sensory quality  
651 characteristics of blueberry fruit from twelve cultivars. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 19–26.  
652 <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.01.008>
- 653 Scalzo, J., Stevenson, D., Hedderley, D., 2015. Polyphenol compounds and other quality traits in  
654 blueberry cultivars. *J. Berry Res.* 5, 117–130. <https://doi.org/10.3233/JBR-150097>
- 655 Scalzo, J., Stevenson, D., Hedderley, D., 2013. Blueberry estimated harvest from seven new  
656 cultivars: Fruit and anthocyanins. *Food Chem.* 139, 44–50.

- 657 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.091>
- 658 Schuchovski, C., Sant'Anna-Santos, B.F., Marra, R.C., Biasi, L.A., 2020. Morphological and  
659 anatomical insights into de novo shoot organogenesis of in vitro 'Delite' rabbiteye blueberries.  
660 *Heliyon* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05468>
- 661 Siebeneichler, T.J., Crizel, R.L., Camozatto, G.H., Paim, B.T., da Silva Messias, R., Rombaldi,  
662 C.V., Galli, V., 2020. The postharvest ripening of strawberry fruits induced by abscisic acid  
663 and sucrose differs from their in vivo ripening. *Food Chem.* 317, 1–11.  
664 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126407>
- 665 Singleton, V., Rossi, J., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-  
666 phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- 667 Skrede, G., Wrolstad, R.E., Durst, R.W., 2000. Changes in anthocyanins and polyphenolics during  
668 juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J. Food Sci.* 65, 357–  
669 364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16007.x>
- 670 Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., Sochor, J., 2015. Bioactive compounds  
671 and antioxidant activity in different types of berries. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 24673–24706.  
672 <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
- 673 Souza, V.R.D. de, 2017. Heat treatment with steam and addition of xanthan to preserve phenolic  
674 bioactive compounds and the antioxidant activity of blueberry pulp. Federal University of  
675 Pelotas.
- 676 Spinardi, A., Cola, G., Gardana, C.S., Mignani, I., 2019. Variation of Anthocyanin Content and  
677 Profile Throughout Fruit Development and Ripening of Highbush Blueberry Cultivars Grown  
678 at Two Different Altitudes. *Plant Sci.* 10, 1–33. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01045>
- 679 Stevenson, D., Scalzo, J., 2012. Anthocyanin composition and content of blueberries from around  
680 the world. *J. Berry Res.* 2, 179–189. <https://doi.org/10.3233/JBR-2012-038>
- 681 Sun, C., Liu, Y., Zhan, L., Rayat, G.R., Xiao, J., Jiang, H., Li, X., Chen, K., 2020. Anti-diabetic  
682 effects of natural antioxidants from fruits. *Trends Food Sci. Technol.* 1–12.  
683 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.024>
- 684 Sun, L.-Q., Ding, X.-P., Qi, J., Yu, H., He, S., Zhang, J., Ge, H.-X., Yu, B.-Y., 2012. Antioxidant  
685 anthocyanins screening through spectrum–effect relationships and DPPH-HPLC-DAD analysis  
686 on nine cultivars of introduced rabbiteye blueberry in China. *Food Chem.* 132, 759–765.  
687 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.030>

- 688 Tan, K., Lee, W.S., Gan, H., Wang, S., 2018. Recognising blueberry fruit of different maturity  
689 using histogram oriented gradients and colour features in outdoor scenes. *Biosyst. Eng.* 176,  
690 59–72. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2018.08.011>
- 691 Travica, N., D’Cunha, N.M., Naumovski, N., Kent, K., Mellor, D.D., Firth, J., Georgousopoulou,  
692 E.N., Dean, O.M., Loughman, A., Jacka, F., Marx, W., 2020. The effect of blueberry  
693 interventions on cognitive performance and mood: A systematic review of randomized  
694 controlled trials. *Brain. Behav. Immun.* 85, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.04.001>
- 695 Upadhaya, S., Dwivedi, P., 2019. The role and potential of blueberry in increasing deforestation in  
696 southern Georgia, United States. *Agric. Syst.* 173, 39–48.  
697 <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.01.002>
- 698 Vizzotto, M., Araujo, V.F., Pereira, M.C., Bialves, T.S., Vignolo, G.K., 2013. Phenolic compounds  
699 and antioxidant activity of different cultivars and blueberry selections for the highbush and  
700 rabbiteye groups.
- 701 Wang, H., Guo, X., Hu, X., Li, T., Fu, X., Liu, R.H., 2017. Comparison of phytochemical profiles,  
702 antioxidant and cellular antioxidant activities of different varieties of blueberry (*Vaccinium*  
703 spp.). *Food Chem.* 217, 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.002>
- 704 Wang, L.-J., Wu, J., Wang, H.-X., Li, S.-S., Zheng, X.-C., Du, H., Xu, Y.-J., Wang, L.-S., 2015.  
705 Composition of phenolic compounds and antioxidant activity in the leaves of blueberry  
706 cultivars. *J. Funct. Foods* 16, 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.027>
- 707 Wang, S.Y., Chen, H., Camp, M.J., Ehlenfeldt, M.K., 2012. Flavonoid constituents and their  
708 contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium*  
709 *ashei* Reade). *Food Chem.* 132, 855–864. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.050>
- 710 Yousef, G.G., Brown, A.F., Funakoshi, Y., Mbeunkui, F., Grace, M.H., Ballington, J.R., Loraine,  
711 A., Lila, M.A., 2013. Efficient Quantification of the Health-Relevant Anthocyanin and  
712 Phenolic Acid Profiles in Commercial Cultivars and Breeding Selections of Blueberries  
713 (*Vaccinium* spp.). *J. Agric. Food Chem.* 61, 4806–4815. <https://doi.org/10.1021/jf400823s>
- 714 Zeng, Q., Dong, G., Tian, L., Wu, H., Ren, Y., Tamir, G., Huang, W., Yu, H., 2020. High Altitude  
715 Is Beneficial for Antioxidant Components and Sweetness Accumulation of Rabbiteye  
716 Blueberry. *Front. Plant Sci.* 11, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.573531>
- 717 Zhang, J., Nie, J. yun, Li, J., Zhang, H., Li, Y., Farooq, S., Bacha, S.A.S., Wang, J., 2020.  
718 Evaluation of sugar and organic acid composition and their levels in highbush blueberries from

719 two regions of China. *J. Integr. Agric.* 19, 2352–2361. <https://doi.org/10.1016/S2095->  
720 3119(20)63236-1

721 Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in  
722 mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*  
723 [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

724 Zhu, Y., Sun, J., Lu, W., Wang, X., Wang, X., Han, Z., Qiu, C., 2017. Effects of blueberry  
725 supplementation on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized  
726 clinical trials. *J. Hum. Hypertens.* 31, 165–171. <https://doi.org/10.1038/jhh.2016.70>

727

728 **Tabela 1**

729 Parâmetros físico-químicos (pH, AT, SS, SS/AT e °Hue) em frutos de mirtilheiro, oriundos de sete  
730 cultivares comerciais e seis genótipos.

Cultivares/Genótipos	pH	AT (mg 100g <sup>-1</sup> ácido málico)	SS (°Brix)	SS/ATT	°Hue
Bluebelle	3,31±0,15 b	0,51±0,06 abc	15,97±0,10 ab	6,55±0,96 c	288,44±0,64 <sup>ns</sup>
Bluegem	3,32±0,03 b	0,72±0,09 a	15,51±0,63 abc	4,67±0,56 c	286,30±3,65 <sup>ns</sup>
Briteblue	3,23±0,12 b	0,73±0,09 a	15,62±0,44 abc	4,56±0,74 c	283,96±1,04 <sup>ns</sup>
Climax	3,28±0,04 b	0,67±0,08 ab	16,89±0,42 a	4,95±0,64 c	293,62±7,16 <sup>ns</sup>
Delite	3,26±0,15 b	0,70±0,08 a	14,79±0,21 bcde	4,73±0,75 c	289,08±0,53 <sup>ns</sup>
Powderblue	3,27±0,04 b	0,70±0,13 ab	15,08±0,32 bcd	4,82±0,86 c	289,05±1,49 <sup>ns</sup>
Woodard	3,28±0,10 b	0,64±0,08 ab	15,53±0,45 abc	5,18±0,80 c	286,89±1,50 <sup>ns</sup>
PW1	3,76±0,07 a	0,23±0,05 d	13,33±0,12 f	16,83±4,52 a	290,06±0,84 <sup>ns</sup>
PW2	3,38±0,06 b	0,55±0,14 abc	14,54±1,04 cdef	6,46±1,49 c	290,16±24,34 <sup>ns</sup>
BB3	3,35±0,02 b	0,29±0,10 cd	14,07±0,38 def	12,31±3,49 ab	291,71±1,25 <sup>ns</sup>
BB4	3,31±0,08 b	0,43±0,03 bcd	14,89±0,40 bcde	7,64±0,53 bc	289,92±3,09 <sup>ns</sup>
PW5	3,25±0,04 b	0,57±0,03 ab	14,87±0,62 bcde	5,75±0,33 c	284,37±4,65 <sup>ns</sup>
BB6	3,35±0,09 b	0,59±0,13 ab	13,52±0,21 ef	5,88±1,27 c	305,41±5,39 <sup>ns</sup>
CV (%)	2,62	15,91	3,18	25,55	2,58

731 Resultados expressos em médias de três repetições ± desvio padrão (mg 100g<sup>-1</sup> massa úmida). Letras iguais na mesma  
732 coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). CV (%): coeficiente de variação. ns: não significativo pelo teste  
733 F (p≤0,05) da análise de variância.

734

735

736

737 **Tabela 2**

738 Compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas totais em frutos de mirtilheiro, oriundos  
 739 de sete cultivares comerciais e seis genótipos.

Cultivares/Genótipos	Fenólicos Totais (mg 100g <sup>-1</sup> ácido gálico)	Flavonoides Totais (mg 100g <sup>-1</sup> catequina)	Antocianinas Totais (mg 100g <sup>-1</sup> pelargonidina)
Bluebelle	5,63±0,21 ab	8,20±0,77 bc	6,48±0,31 e
Bluegem	5,58±0,28 ab	10,06±0,52 a	7,95±0,88 cde
Briteblue	5,66±0,61 ab	9,47±0,19 ab	8,86±0,52 bc
Climax	5,59±0,30 ab	8,81±0,36 ab	10,11±0,69 ab
Delite	5,39±0,01 ab	8,74±0,39 ab	8,66±1,14 bcd
Powderblue	5,84±0,06 ab	9,62±0,45 ab	7,76±0,74 cde
Woodard	5,63±0,07 ab	9,07±0,61 ab	8,76±1,00 bc
PW1	5,87±0,11 a	10,31±0,59 a	9,38±0,47 bc
PW2	5,51±0,09 ab	10,03±0,47 a	6,14±0,81 e
BB3	5,17±0,41 ab	9,72±0,54 ab	9,05±0,37 bc
BB4	5,00±0,39 b	5,80±0,48 d	7,38±0,43 cde
PW5	5,78±0,13 ab	8,96±0,83 ab	11,71±0,79 a
BB6	5,28±0,34 ab	7,04±0,49 cd	6,60±0,41 de
CV (%)	5,19	6,04	8,43

740 Resultados expressos em médias de três repetições ± desvio padrão (mg 100g<sup>-1</sup> massa seca). Letras iguais na mesma  
 741 coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). CV (%): coeficiente de variação.

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753 **Tabela 3**

754 Atividade antioxidante em frutos de mirtilheiro por meio dos protocolos DPPH e ABTS, oriundos de  
 755 sete cultivares comerciais e seis genótipos.

Cultivares/Genótipos	DPPH ( $\mu\text{Mol Trolox } 100\text{g}^{-1}$ )	ABTS ( $\mu\text{Mol Trolox } 100\text{g}^{-1}$ )
Bluebelle	4,44 $\pm$ 0,05 de	39,02 $\pm$ 0,77 def
Bluegem	6,05 $\pm$ 0,18 ab	46,23 $\pm$ 0,63 a
Briteblue	5,67 $\pm$ 0,11 bc	42,14 $\pm$ 0,36 bcd
Climax	5,33 $\pm$ 0,12 bc	40,69 $\pm$ 0,97 cde
Delite	5,10 $\pm$ 0,55 cd	43,27 $\pm$ 0,93 abc
Powderblue	5,49 $\pm$ 0,35 bc	38,15 $\pm$ 0,73 ef
Woodard	5,18 $\pm$ 0,23 cd	43,35 $\pm$ 0,33 abc
PW1	6,65 $\pm$ 0,27 a	42,14 $\pm$ 0,80 bcd
PW2	5,69 $\pm$ 0,03 bc	35,74 $\pm$ 1,59 f
BB3	5,05 $\pm$ 0,23 cde	44,65 $\pm$ 1,41 ab
BB4	3,27 $\pm$ 0,21 f	28,31 $\pm$ 2,95 g
PW5	5,52 $\pm$ 0,40 bc	41,58 $\pm$ 1,03 bcde
BB6	4,23 $\pm$ 0,39 e	36,44 $\pm$ 0,39 f
CV (%)	5,38	2,98

756 Resultados expressos em médias de três repetições  $\pm$  desvio padrão ( $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  massa seca). Letras iguais na mesma  
 757 coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). CV (%): coeficiente de variação.

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769 **Tabela 4**

770 Quantificação de antocianinas individuais (malvidina-3-O-glicosídeo; malvidina-3-O-galactosídeo;  
 771 cianidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-galactosídeo; delphinidina-3-O-galactosídeo) em frutos de  
 772 mirtilheiro, oriundos de sete cultivares comerciais.

Cultivares/Genótipos	Malvidina-3-O-glicosídeo	Malvidina-3-O-galactosídeo	Cianidina-3-O-glicosídeo	Cianidina-3-O-galactosídeo	Delfinidina-3-O-galactosídeo
(mg 100 g <sup>-1</sup> malvidina)					
Bluebelle	61,33±5,03 a	103,33±11,71 <sup>ns</sup>	16,33±1,15 bc	13,67±1,53 c	10,33±1,53 b
Bluegem	63,00±4,36 a	108,00±4,58 <sup>ns</sup>	15,00±1,00 bc	18,33±3,05 bc	11,67±1,15 b
Briteblue	20,33±2,08 c	111,33±8,5 <sup>ns</sup>	22,33±3,05 a	71,00±2,64 a	34,67±2,08 a
Climax	18,33±2,52 c	91,00±6,08 <sup>ns</sup>	21,33±2,08 a	71,67±2,52 a	31,33±2,08 a
Delite	51,33±2,08 b	90,33±6,66 <sup>ns</sup>	19,67±1,15 ab	22,67±1,53 b	10,00±1,00 b
Powderblue	49,00±3,00 b	94,67±6,66 <sup>ns</sup>	12,00±1,00 c	21,67±2,31 b	12,33±3,05 b
Woodard	47,00±1,00 b	103,67±6,66 <sup>ns</sup>	15,00±2,00 bc	20,67±1,53 b	9,33±2,52 b
CV (%)	7,09	7,55	10,28	6,53	11,91

773 Resultados expressos em médias de três repetições ± desvio padrão (mg 100g<sup>-1</sup> massa seca). Letras iguais na mesma  
 774 coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). CV (%): coeficiente de variação. ns: não significativo pelo teste  
 775 F (p≤0,05) da análise de variância.

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787 **Tabela 5**

788 Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis pH, Acidez titulável (AT), Sólidos  
 789 Solúveis (SS), relação SS/AT, °Hue, DPPH, ABTS, Fenólicos Totais, Flavonoides Totais e  
 790 Antocianinas Totais.

	pH	AT	SS	SS/AT	°Hue	DPPH	ABTS	Fenólicos Totais	Flavonoides Totais	Antocianinas Totais
pH	1									
ATT	-0.66**	1								
SS	-0.44*	0.50**	1							
SS/AT	0.77**	-0.89**	-0.54**	1						
°Hue	0.13 <sup>ns</sup>	0.02 <sup>ns</sup>	-0.19 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	1					
DPPH	0.38**	0.01 <sup>ns</sup>	-0.06 <sup>ns</sup>	0.21 <sup>ns</sup>	-0.24 <sup>ns</sup>	1				
ABTS	0.01 <sup>ns</sup>	0.16 <sup>ns</sup>	0.08 <sup>ns</sup>	0.02 <sup>ns</sup>	-0.22 <sup>ns</sup>	0.65**	1			
Fenólicos Totais	0.21 <sup>ns</sup>	0.17 <sup>ns</sup>	0.16 <sup>ns</sup>	-0.05 <sup>ns</sup>	-0.20 <sup>ns</sup>	0.56**	0.35*	1		
Flavonoides Totais	0.20 <sup>ns</sup>	0.03 <sup>ns</sup>	-0.02 <sup>ns</sup>	0.15 <sup>ns</sup>	-0.33*	0.88**	0.70**	0.47**	1	
Antocianinas Totais	-0.03 <sup>ns</sup>	-0.06 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	0.12 <sup>ns</sup>	-0.29 <sup>ns</sup>	0.32*	0.44*	0.19 <sup>ns</sup>	0.27 <sup>ns</sup>	1

791 \*, \*\* Significativo em  $p \leq 0,05$  e  $p \leq 0,01$ , respectivamente, pelo teste Tukey. ns: não significativo pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ) da  
 792 análise de variância.

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808