



Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo "Rabbiteye" (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante

Spagolla, L.C.¹; Santos, M.M.¹, Passos, L.M.L.², Aguiar, C.L.^{2*}

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Norte do Paraná, UNOPAR, Londrina – PR

²Departamento de Agroindústria, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ, Piracicaba – SP

Recebido 06/04/2009 / Aceito 24/09/2009

RESUMO

Uma infinidade de produtos de cosmetologia tem utilizado mirtilo, uma pequena fruta com inúmeras alegações de propriedades biológicas, na formulação de uma variedade de produtos como cremes hidratantes, esfoliantes, protetores da radiação ultravioleta, entre outros. Neste sentido, a composição química desta pequena fruta é associada a estas propriedades biológicas, no entanto, poucos relatos científicos são encontrados na literatura. Desta forma, o presente estudo avaliou os teores de compostos fenólicos e de flavonóides, bem como a relação destes compostos com a atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos preparados a partir de frutas de mirtilo cv. "Rabbiteye" (*Vaccinium ashei*). Diferentes proporções de álcool (etanol ou metanol) em água deionizada (ou seja, 40:60, 60:40 e 80:20 (v/v)) foram avaliados quanto à capacidade de extração de fenólicos totais e de flavonóides de amostras de mirtilo em duas condições: frescas (frutas in natura) e secas (após secagem a 105°C por 15 h). Todas as extrações alcoólicas foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação. Dentre as proporções utilizadas para a extração dos compostos fenólicos foi verificado que, em geral, a mistura metanol/água 80:20 (v/v) e a mistura etanol/água 60:40 (v/v) foram os que apresentaram maiores teores de fenólicos e flavonóides totais, e que houve uma correlação positiva forte entre as concentrações de fenólicos e de flavonóides com a atividade antioxidante daqueles extratos hidroalcoólicos de mirtilo, segundo análise do coeficiente de correlação de Pearson.

Palavras-chave: Mirtilo. Extração. Fenólicos. Flavonóides. Antioxidante.

INTRODUÇÃO

A cultura do mirtilo (*Vaccinium ashei*) é recente e ainda pouco conhecida no Brasil. Sua inserção no país

deu-se em 1983, por uma coleção de plantas trazidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa/CPACT, Pelotas/RS), sendo comercializada no país a partir de 1990 (Embrapa, 2008). Também conhecida por *blueberry*, arândano ou uva-do-monte, é uma fruta da família das Ericaceae e se inclui no grupo de pequenas frutas, como amoras, morangos e framboesas (Sousa et al., 1995). É um fruto muito apreciado pelo seu sabor exótico, valor comercial e suas alegações terapêuticas, sendo considerado como a "fonte de longevidade", a qual pode ser associada, segundo Madail & Santos (2004), ao alto teor de antocianidinas. Apresenta em sua composição uma variedade de vitaminas (A, B, C, K, ácido fólico), minerais (potássio, magnésio, cálcio, fósforo, ferro, manganês), açúcares, pectina, taninos e os ácidos cítrico, málico e tartárico (Silveira et al., 2007).

Dos extratos vegetais testados por Katsube et al. (2004) e Madhavi et al. (1998), os extratos obtidos de mirtilo continham grande quantidade de compostos fenólicos, principalmente antocianinas, as quais apresentam grande capacidade no seqüestro de radicais do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), sendo que delphinidina e malvidina isoladas de mirtilo, induziram apoptose em células tumorais HL60. Estes compostos possuem grande importância devido a múltiplos efeitos biológicos, como diminuição da permeabilidade e fragilidade dos vasos sanguíneos, ação antiinflamatória, antiespasmódica, antioxidante, antiviral, antibacteriana e antitumoral (Pozzi, 2007).

Neste estudo foram avaliados os teores de fenólicos e flavonóides totais, assim como a capacidade antioxidante total após extração hidroetanólica e hidrometanólica de frutos de mirtilo cv. 'Rabbiteye' (*Vaccinium ashei*).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos frutos de mirtilo

As amostras de mirtilo (*Vaccinium ashei*) coletadas, em janeiro de 2008, de plantas sadias da Fazenda Saint'Clair de Vasconcelos, município de Campos do Jordão/SP, localizado a 1628 m do nível do mar, com latitude 22°44'22"S e longitude 45°35'29"W, temperatura média de 15,2°C e precipitação média de 1891 mm, com predominância de clima temperado de altitude. O solo é

Autor correspondente: Claudio Lima de Aguiar - Núcleo de Açúcar e Álcool - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz de Piracicaba - Universidade de São Paulo - Av. Pádua Dias, 11 - CEP.13418-900 - Piracicaba - SP
e-mail: claguiar@esalq.usp.br

caracterizado por textura média (50% de argila, 25% de silte e 25% de areia quartznosa) com alto teor de matéria orgânica.

Preparo dos extratos hidroalcoólicos de mirtilo (EHA)

Os EHA-mirtilo foram preparados pela adição de 15 mL das soluções alcoólicas (etanol ou metanol; Merck KGaA, Darmstad, Alemanha) em diferentes proporções em água destilada. Dois grupos foram considerados durante a extração alcoólica, sendo

Tratamento 1: mistura hidroalcoólica com 5 g de polpa triturada de frutas frescas congeladas e trituradas.

Tratamento 2: mistura hidroalcoólica com 5 g de polpa triturada das frutas secas por 15 h a 105°C em estufa com ventilação forçada 320-SE (Fanem, Brasil).

Após secagem, as amostras foram moidas em moinho de facas tipo Willye (Tecnal, Brasil) até granulometria de 200 mesh. As diferentes proporções alcoólicas em água deionizada são ilustradas, conforme descrição na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição das soluções hidroalcoólicas utilizadas na extração de compostos fenólicos de mirtilo "Rabbiteye" (*Vaccinium ashei*).

Solução hidroalcoólica	Composição
Tratamento 1: 5 g da fruta in natura congelada e triturada	
EtOH 40%	40 mL de etanol P.A. em 60 mL de água + 5 g de frutas frescas
EtOH 60%	60 mL de etanol P.A. em 40 mL de água + 5 g de frutas frescas
EtOH 80%	80 mL de etanol P.A. em 20 mL de água + 5 g de frutas frescas
MeOH 40%	40 mL de metanol P.A. em 60 mL de água + 5 g de frutas frescas
MeOH 60%	60 mL de metanol P.A. em 40 mL de água + 5 g de frutas frescas
MeOH 80%	80 mL de metanol P.A. em 20 mL de água + 5 g de frutas frescas
Solução hidroalcoólica	Composição
Tratamento 2: 5 g da fruta seca à 105°C por 15 h e triturada em moinho de facas (200 mesh)	
EtOH 40%	40 mL de etanol P.A. em 60 mL de água + 5 g de frutas secas
EtOH 60%	60 mL de etanol P.A. em 40 mL de água + 5 g de frutas secas
EtOH 80%	80 mL de etanol P.A. em 20 mL de água + 5 g de frutas secas
MeOH 40%	40 mL de metanol P.A. em 60 mL de água + 5 g de frutas secas
MeOH 60%	60 mL de metanol P.A. em 40 mL de água + 5 g de frutas secas
MeOH 80%	80 mL de metanol P.A. em 20 mL de água + 5 g de frutas secas

A extração foi feita a 70°C por 1h, sendo as amostras mantidas em tubos plásticos hermeticamente fechados e homogeneizadas a cada 15 min. em agitador Phoenix AP-56 (Araraquara, SP). Em seguida, as amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 1 e os filtrados transferidos individualmente para tubos de ensaio com tampa de rosca (25'150 mm). Aos resíduos foram adicionados um volume adicional de 10 mL das soluções alcoólicas, sendo executado mais um processo extrativo, conforme já descrito. Os filtrados obtidos das duas extrações foram homogeneizados em tubos de ensaio com tampa de rosca e acondicionados a 4°C até serem submetidos às análises subseqüentes.

Quantificação de fenólicos e flavonóides totais

A determinação espectrofotométrica de fenólicos totais foi realizada de acordo com metodologia descrita em Nozella (2001). Em tubos de ensaio foram adicionados 0,05 mL do sobrenadante referente a cada diluição da amostra em água (em triplicata), 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1 N) diluído 1:10 (v/v), 450 µL de água

destilada e 1,25 mL de carbonato de sódio (20%, m/v). Os tubos foram agitados e após 40 min. foi feita a leitura a 725 nm. O teor de fenóis totais foi calculado em equivalente de ácido tânico, e expresso em microgramas de fenóis por grama de amostra. A concentração de flavonóides totais foi determinada como descrito por Jurd & Geissman (1956). A leitura foi feita a 415 nm, em espectrofotômetro Mod. Cintra-5 (GBC Co.) utilizando-se solução a 2% de cloreto de alumínio em metanol P.A. Para quantificar o teor de flavonóides totais nas amostras, foram adicionados volumes de 0,5 mL dos EAM a uma solução de 0,1 mL de nitrato de alumínio a 10% (m/v) e 0,1 mL de acetato de potássio a 1 M. O volume final foi completado com 4,3 mL de uma solução a 70% de etanol. As amostras foram homogeneizadas a temperatura ambiente e após 40 min. foram feitas as leituras em espectrofotômetro contra curva-padrão de rutina nas concentrações de 5 a 50 µg/mL em solução a 70% (m/v) etanol. Os valores de flavonóides totais foram expressos como equivalentes de rutina (microgramas de rutina em 1,0 mL de extrato alcoólico de mirtilo).

Capacidade antioxidante total

O método de complexação pelo fosfomolibdênio para determinação da capacidade antioxidante total (CAT) foi realizado em espectrofotômetro a 695 nm (Prieto et al., 1999; Ferrari, 2002; Aycicek et al., 2008). Aliquotas de 0,1 mL dos EAM foram adicionados de 1 mL de uma mistura compreendida de ácido sulfúrico a 0,6 M, fosfato monobásico de sódio a 28 mM e molibdato de sódio a 4 mM. Os tubos, hermeticamente fechados, foram aquecidos a 95°C por 90 min. Após as amostras terem atingido temperatura ambiente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro contra tubo controle (0,1 mL de água destilada acrescido de 1 mL do Reativo). A curva de calibração foi elaborada com ácido ascórbico P.A. (Nuclear; Brasil) nas concentrações de 10 a 200 µM e a capacidade antioxidante total dos EAM são expressos em equivalentes de ácido ascórbico (mmol de ácido ascórbico por mL de solução).

RESULTADOS

As análises dos teores de fenólicos e flavonóides totais das amostras de EAM são apresentadas nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

As proporções dos álcoois em água, adequadas à extração dos compostos fenólicos dos frutos de mirtilo foram investigadas, e foi encontrado que as soluções hidroetanólicas na proporção de 60:40 (v/v), bem como as soluções hidrometanólicas na proporção de 60:40 e 80:20 (v/v), foram estatisticamente semelhantes, e capazes de extrair uma maior quantidade de fenólicos totais da polpa fresca triturada de mirtilo (Figura 1). Foi observado também que para aquelas amostras de mirtilo, na qual foi feita a secagem (105°C/15h), as proporções álcool:água que melhor apresentaram extrações dos compostos fenólicos, foram os sistemas etanol:água a 40:60 (v/v) e 60:40 (v/v), bem como, para os sistemas metanol:água, a proporção 60:40 (v/v).

Os teores totais de flavonóides foram sempre superiores a 10,0 µg/mL do extrato alcoólico, e com uma variação de aproximadamente 10,0 a 15,0 µg/mL de

flavonóides totais para as amostras de frutas frescas e de 27,0 a 45,0 µg/mL para as amostras de frutas secas. Pôde-se observar, no entanto, uma grande variação dos teores de fenólicos e flavonóides totais de acordo com a proporção álcool:água utilizada para a extração e entre os tratamentos (frescas ou secas).

Estatisticamente, os valores da capacidade antioxidante total dos EAM de frutas secas foram superiores àqueles encontrados nas amostras frescas. Em média, os EAM de frutas secas apresentaram 20% a mais a CAT em relação aos EAM de frutas frescas. Dado que a capacidade antioxidante está associada aos teores de compostos fenólicos nas amostras vegetais (Moraes-de-Souza et al., 2008), este fato foi corroborado neste trabalho, visto que as amostras de frutas secas apresentaram teores mais altos de flavonóides (2,12 g/mL de EAM) quando comparado aos 0,67 g flavonóides/mL de EHA de mirtilo, nas amostras de frutas frescas (umidade relativa; UR = 85%).

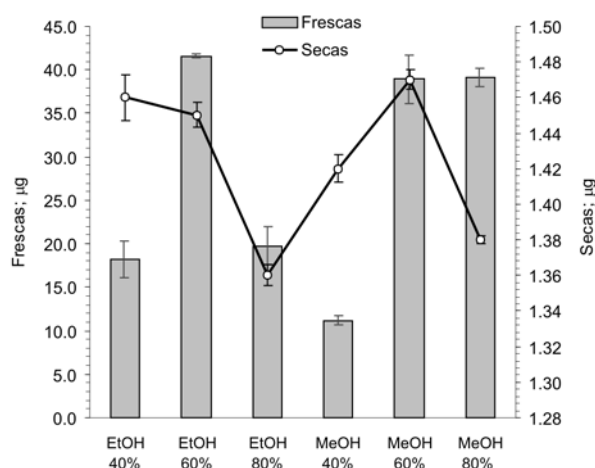


Figura 1. Fenólicos totais dos extratos alcoólicos obtidos de frutas frescas de mirtilo (*Vaccinium ashei*). Valores representam a média da triplicata ± desvio padrão. As letras indicam que os teores diferem estatisticamente entre si para $p < 0,05$.

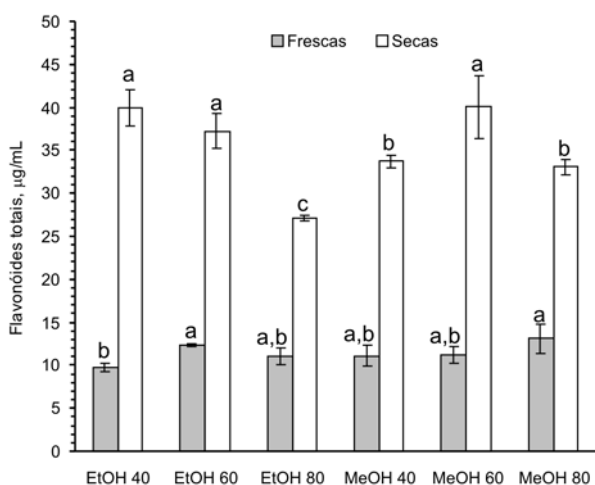


Figura 2. Flavonóides totais dos extratos alcoólicos obtidos de mirtilo (*Vaccinium ashei*). Diferentes letras indicam que os conteúdos estatisticamente diferentes entre amostras do mesmo tratamento ($p < 0,05$). Valores representam a média da triplicata ± desvio padrão.

O teor de compostos fenólicos, entre os dois tratamentos, foi significativamente diferente, sendo que as amostras de frutas frescas apresentaram valores totais, em média, de 22,1 vezes maior que os conteúdos encontrados para cada tratamento extrativo realizado nas amostras de frutas secas. O teor total de fenólicos, nas amostras de EHA-mirtilo foi de 680 mg/100g de fruta fresca (UR = 85%) e de 34 mg/100g de frutas secas.

Na Figura 3, os valores da capacidade antioxidante total (CAT), de acordo com o método da redução do molibdênio-VI em meio ácido, foram descritos em função da solução alcoólica extrativa, tal qual foi descrito por Prieto (1999).

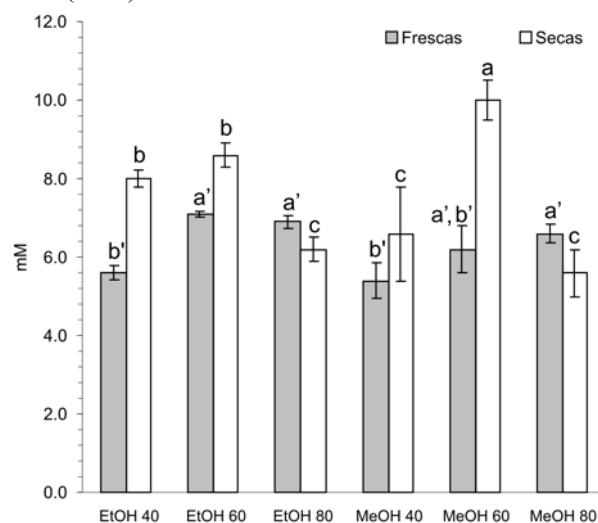


Figura 3. Capacidade antioxidante total (CAT) dos extratos alcoólicos obtidos de mirtilo (*Vaccinium ashei*). Diferentes letras indicam que os conteúdos estatisticamente diferentes entre amostras do mesmo tratamento (Frescas: a, b, c e; Secas: a', b', c') ($p < 0,05$). Valores representam a média da triplicata ± desvio padrão.

De acordo com a Tabela 2, tanto o aumento nos teores de fenólicos ou de flavonóides tiveram uma correlação positiva com a capacidade antioxidante total de seus extratos alcoólicos contra a reação do molibdato em meio ácido. O maior coeficiente de correlação foi obtido para interação teor de fenólicos com teor de flavonóides ($r = 0,94$), a qual descreve uma correlação positiva forte ($0,8 < r < 1$), de acordo com os conceitos do coeficiente de correlação de Pearson. Da mesma forma, as interações de fenólicos totais versus capacidade antioxidante ($r = 0,89$) e flavonóides versus capacidade antioxidante ($r = 0,77$) apresentaram-se positivas fortes ($0,8 < r < 1$) e positiva moderada ($0,5 < r < 0,8$), respectivamente.

Tabela 2 - Coeficientes de correlação de Pearson entre os teores de fenólicos e flavonóides totais e a capacidade antioxidante total (n=6).

Correlação	r	n
Fenólicos x Flavonóides	0,94	6
Fenólicos x Capacidade Antioxidante	0,89	6
Flavonóides x Capacidade Antioxidante	0,77	6

DISCUSSÃO

A análise do teor dos principais componentes biologicamente ativos em matérias-primas de origem

vegetal ou de fitoterápicos é uma etapa essencial para a segurança e eficácia de sua utilização na elaboração de produtos farmacêuticos (Williamson, 2001). Mirtilo é uma fruta pouco difundida no Brasil, dado ao seu baixo apelo comercial (Madail & Santos, 2004), no entanto, por se tratar de rica fonte de antocianinas (Skrede et al., 2000), tem sido estudada quanto aos seus teores de compostos fenólicos e associações quanto à sua atividade antioxidante. Entre estes compostos fenólicos, as antocianinas são metabólitos amplamente encontrados nas células vegetais, sendo necessário sua extração para uma adequada quantificação e utilização.

Segundo resultados de estudos de Aguiar (2004) e Aguiar et al. (2007), é aparente que as soluções hidroetanólicas (60:40; v/v) extraíram grandes quantidades de flavonóides de soja (87 mg/100g de soja, em b.s.); entretanto, soluções hidrometanólicas nas proporções de 80:20 e 90:10 (v/v) extraíram quantidades ainda maiores de flavonóides do farelo de soja. Desta forma, pôde-se observar no presente estudo, que soluções hidroetanólica a 60% (solução de 60 partes de etanol em 40 partes de água), hidrometanólica a 60% e hidrometanólica a 80% (soluções de 60 e 80 partes de metanol em 40 e 20 partes de água, respectivamente) apresentaram melhor capacidade de extração de compostos fenólicos, como os flavonóides, conforme também descrito nos estudos de Aguiar (2004) e Aguiar et al. (2007). Outros métodos de extração de flavonóides foram estudados também por Hutabarat et al. (2000), que verificaram a eficiência da extração de compostos fenólicos levemente polares requeria o uso de solventes polares. De acordo com estudos de Eldridge (1982), Barbuch et al. (1989) e Ikeda et al. (1995), a solução hidrometanólica numa proporção de 80:20 (v/v; metanol:água) foi a mais eficiente na extração de compostos fenólicos, da mesma forma que foi encontrado no presente trabalho. Para os teores de flavonóides, as soluções de extração compostas por etanol a 60%, metanol a 60% e metanol a 80% foram levemente superiores aos demais tratamentos, muito embora, estatisticamente apenas os valores obtidos para solução de etanol a 40% foi inferior aos demais ($P < 0,05$).

Cabe ressaltar que embora etanol e metanol tenham apresentado boas capacidades de extração dos fenólicos e flavonóides totais, nem todas as proporções do álcool em água foram capazes de extrair um máximo do teor de fenólicos totais contidos nas amostras. Efetivamente, o sistema que demonstrou pouca eficiência na extração de fenólicos e flavonóides totais das amostras de mirtilo, tanto frescas quanto secas, em geral, foram os compostos por solução hidrometanólica a 40:60 (v/v) e hidroetanólica a 80:20 (v/v).

Segundo Rauha et al. (2000), os flavonóides são reconhecidamente agentes antioxidantes capazes de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade. Por outro lado, o uso de modelos simplificados para avaliar a atividade antioxidante é muito importante para estudos na determinação das propriedades biológicas dos alimentos (Koleva et al., 2002).

Dentre as diferentes proporções de álcool (etanol ou metanol) em água deionizada, que foram avaliadas quanto à capacidade de extração de fenólicos totais e de flavonóides de amostras de mirtilo em duas condições: frescas e secas, conclui-se que as misturas metanol/água 80:20 (v/v) e a

mistura etanol/água 60:40 (v/v) foram as que apresentaram maiores teores de fenólicos e flavonóides totais, e que houve uma correlação positiva forte entre as concentrações de fenólicos e de flavonóides com a atividade antioxidante daqueles extratos hidroalcoólicos de mirtilo, segundo análise do coeficiente de correlação de Pearson.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à colaboração do técnico Jorge Moraes Donato, da Universidade Norte do Paraná, Londrina, Brasil; e à Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular (Funadesp, Brasília/DF) pelo suporte financeiro para realização deste projeto de pesquisa.

ABSTRACT

*Alcoholic extracts of total phenolics and flavonoids from rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) and their antioxidant activity*

A wide range of cosmetic products, including moisturizers, exfoliating scrubs and sunscreens, have been formulated with blueberry, a small fruit with innumerable claims to biological properties. Although the chemical composition of these fruits has been associated with these biological properties, few studies can be found in the literature. In the present study, the phenolic and flavonoid contents of hydroalcoholic extracts of the rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) were analyzed and the correlation of these compounds with the antioxidant activity of the extracts investigated (by Pearson's correlation coefficient). Various mixtures of alcohol (ethanol or methanol) with deionized water (40:60, 60:40 and 80:20 (v/v)) were tested for their capacity to extract phenolics and flavonoids from blueberries in two conditions: fresh (as picked) and dried (at 105°C for 15 h). All the extractions were carried out at room temperature with shaking. Out of all the solvent mixtures used for the extractions it was found that, in general, the 80:20 (v/v) methanol/water and 60:40 (v/v) ethanol/water mixtures showed the highest phenolic and flavonoid contents, respectively, with a strong positive correlation between the phenolic and flavonoid contents of the blueberry hydroalcoholic extracts and their antioxidant activity.

Keywords: blueberry. Extraction. Phenolics. Flavonoids. Antioxidant.

REFERÊNCIAS

Aguiar CL. Transformações física e bioquímica de isoflavonóides conjugados de soja (*Glycine max* L.) e o efeito na atividade biológica in vitro [Tese] Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp; 2004.

Aguiar CL, Baptista AS, Alencar SM, Haddad R, Eberlin MN. Analysis de isoflavonoids from Leguminous plant extracts by RPHPLC/DAD and electrospray ionization mass spectrometry. *Int J Food Sci Nutr.* 2007; 58:116-24.

- Aycicek A, Kocyigit A, Erel O, Senturk H. Phototherapy causes DNA damage in peripheral mononuclear leukocytes in term infants. *J Pediatr*. 2008; 84(2):141-6.
- Barbuch RJ, Countant JE, Setchell KDR, Welsh MB. The use of thermospray LC/MS/MS for the class identification and structural verification of phytoestrogens in soy protein preparations. *Biomed Environ Mass Spectrom*. 1989; 18:973-7.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. [Internet] Algumas propriedades medicinais. [citado 2008 Out. 8] Disponível em: http://www.cpaact.embrapa.br/programas_projetos/projetos/quintais_organicos/propriedades_medicinais.php.
- Eldridge AC. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates and isolates. *J Agric Food Chem*. 1982; 30:353-5.
- Ferrari CKB. Avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) e colorimetria em 21 alimentos comercializados no município de São Paulo [Tese] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, USP; 2002.
- Hutabarat LS, Greenfield H, Mulholland M. Quantitative determination of isoflavones and coumestrol in soybean by column liquid chromatography. *J Chromatogr. A* 2000; 886:55-63.
- Ikeda R, Ohta NE, Watanabe T. Changes of isoflavones at various stages of fermentation in defatted soybeans. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 1995, 42: 322-7.
- Jurd L, Geissman, TA. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. *J Org Chem*. 1956; 21:1395-401.
- Katsube T, Tabata H, Ohta Y, Anuurad E, Shiwaku K, Yamane Y. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. *J Agric Food Chem*. 2004; 52:2391-6.
- Koleva II, van Beek TA, Linssen JPH, de Groot A, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal*. 2002; 13:8-17.
- Madail JCM, Santos AM. Aspectos econômicos. In: Raseira MCB, Antunes LEC. A cultura do mirtilo. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; 2004. p.67.
- Madhavi DL, Bomser J, Smith MAL, Singletary K. Isolation of bioactive constituents from *Vaccinium myrtillus* (bilberry) fruits and cell cultures. *Plant Sci*. 1998; 131:95-103.
- Moraes-de-Souza RA, Oldoni TLC, Regitano-D'Arce MAB, Alencar SM. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Cien Tecnol Aliment*. 2008; 6:41-7.
- Nozella EF. Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes [Dissertação] Piracicaba: Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP; 2001.
- Pozzi ACS. Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonóides do “maracujá” [Dissertação] São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, USP; 2007.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*. 1999; 269: 337-41.
- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol*. 2000; 56:3-12.
- Skrede G, Wrolsted RE, Durst RW. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J Food Sci*. 2000; 65:357-64.
- Silveira NGA, Vargas PN, Rosa CS. Teor de fenólicos e composição química do mirtilo do grupo Highbush. *Aliment Nutr*. 2007; 18(4):365-70.
- Sousa JSI, Peixoto AM, Toledo FF. Enciclopédia agrícola brasileira. Piracicaba: Edusp; 1995. 508 p.
- Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 2001; 8:401-9.

