

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES -

URI ERECHIM

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DA CASCA DA
JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*) E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE**

RENATA HENTZ

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL

ABRIL DE 2015

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DA CASCA DA JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*) E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Renata Hentz

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof. Eunice Valduga, D. Sc.
Orientadora

Prof. Natalia Paroul, D. Sc.
Orientadora

Prof. Sandro R. Giacomelli, D.Sc.
URI Frederico Westphalen

Prof. Rogério Dallago, D. Sc.
URI Erechim

Erechim, 24 de abril de 2015

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Aos meus pais por todo tipo de incentivo,
apoio e carinho.

Ao Felipe, pela compreensão e amor.

A vocês o meu agradecimento, amor e
admiração!

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre me guiando e iluminando para os melhores caminhos.

À minha família, em especial aos meus pais, Mario e Dirce, pela infinita ajuda, apoio e inspiração, e à minha irmã, Mariana, por estar sempre ao meu lado.

Ao Felipe, pela compreensão, paciência e amor.

A todos os professores que passaram pela minha formação acadêmica e pessoal.

Às minhas orientadoras, Eunice e Natalia, pela orientação e pelos valiosos ensinamentos.

À bolsita de iniciação científica, Suelen, que muito me ajudou do início ao fim, pela disposição e amizade.

Às minhas companheiras de Mestrado, pelo apoio, amizade, conselhos e risadas, e por sempre estarem ao meu lado.

À equipe da Central de Materias, sempre disposta a ajudar.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), pelo seu excelente Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos e por proporcionar a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste projeto, minha eterna gratidão.

“O futuro pertence àqueles que acreditam
na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DA CASCA DA JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*) E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Renata Hentz

Abril/2015

Orientadores: Eunice Valduga

Natalia Paroul

Antocianinas são pigmentos naturais, pertencentes à família dos flavonóides, responsáveis pela coloração de flores, frutas e folhas do azul ao vermelho. A jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) é uma fruta nativa do Brasil e sabe-se que suas cascas são fontes de antocianinas e de importantes compostos fenólicos de elevada ação antioxidante. Apesar da abundância de antocianinas na natureza, padrões comerciais são escassos e apresentam custo elevado. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo otimizar a extração de antocianinas da casca dos frutos da jabuticaba e avaliar sua atividade antioxidante, visando maximizar a quantidade de antocianinas extraídas. Para essa finalidade foram testados dois métodos de extração: maceração com solventes orgânicos (método convencional) e extração com ultrassom usando casca da jabuticaba *in natura* e liofilizada. Para otimizar o processo extrativo, empregou-se a técnica de planejamento de experimentos. No processo de extração convencional, as condições estudadas foram: temperatura, pH

e volume de solvente. No processo de extração com ultrassom, as condições estudadas foram a temperatura e a frequência (kHz). Para a quantificação das antocianinas obtidas utilizou-se o método do pH diferencial, para a avaliação da atividade antioxidante o método do DPPH radical (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e a identificação de antocianinas foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) comparando-se o fator de retenção (F_R) das bandas de antocianinas dos extratos com dados da literatura. Em ensaios preliminares da extração convencional foram testados: etanol, acetona, metanol, acetonitrila e água; sendo que os maiores teores de antocianinas obtidos foram de 169 e 435 mg/100 g em base seca, ao empregar etanol e metanol, respectivamente. Um planejamento fatorial 2^3 permitiu maximizar a extração de antocianinas com teor máximo 435 mg/100 g empregando 100 mL de metanol, 10 g de casca liofilizada, pH=1, temperatura de 40 °C e 3 horas de extração. Este extrato apresentou, também, a maior atividade antioxidante (IC_{50}) de 0,2 mg/ μ L. Na extrações em banho ultrassônico empregou-se o metanol como solvente e os melhores resultados foram de 354 mg de antocianinas totais/100 g em base seca e atividade antioxidante (IC_{50}) de 0,3 mg/ μ L, na condição experimental maximizada (frequência 40 kHz, temperatura 40 °C, 100 mL de metanol, pH=1, 10 g de casca e tempo de extração de 1h). Nestes extratos foram identificadas as seguintes antocianinas: delphinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo.

Palavras-chave: Extração, jabuticaba, antocianinas.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

**OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION OF ANTHOCYANINS OF
JABUTICABA PEELS (*Myrciaria cauliflora*) AND ANTIOXIDANT
CAPACITY EVALUATION**

Renata Hentz

April/2015

Advisors: Eunice Valduga

Natalia Paroul

Anthocyanins are naturally occurring pigments from the family of flavonoids, they are responsible for the coloring of flowers, fruit and leaves, from blue to red. Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) is a fruit native from Brazil and it is known that their peels are sources of major anthocyanins and phenolic compounds with high antioxidant activity. Despite the abundance of anthocyanins in nature, commercial standards have high cost and limited availability. In this context, this study had the objective to optimize anthocyanin extraction of jabuticaba peels and evaluate its antioxidant activity, to maximize the amount of anthocyanins extracted. Two extraction methods were tested: maceration with organic solvents (conventional method) and ultrasound extraction using jabuticaba peel, fresh and lyophilized. To

optimize the extraction process, was used the experimental design technique. In the conventional extraction process, the conditions were: temperature, pH and volume of solvent. In the extraction process with ultrasound, the studied conditions were the temperature and frequency (kHz). For the quantification of anthocyanins was used the differential pH method, for the evaluation of the antioxidant activity the method used was the DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and anthocyanins identification was performed by thin layer chromatography (TLC) by comparing the retention factor (R_F) bands of anthocyanin extracts with literature data. In preliminary tests of conventional extraction, the solvents tested were ethanol, acetone, methanol, acetonitrile and water, the highest anthocyanin content obtained were 169 and 435 mg/100 g by employing ethanol and methanol, respectively. A 2^3 factorial design allowed to maximize the extraction of anthocyanins with maximum content of 435 mg/100 g using 100 mL of methanol, 10 g of lyophilized jabuticaba peel, pH=1, 40 °C temperature and 3 hours of extraction. This extract also presented the highest antioxidant activity (IC_{50}) of 0,2 mg/uL. On the extractions with ultrasonic bath methanol was used as solvent, the best results were 354 mg/100g for anthocyanins and antioxidant activity (IC_{50}) of 0,3 mg/uL, in the maximized experimental conditions (frequency 40 kHz, temperature 40 °C, 100 mL of methanol, pH=1, 10 g of jabuticaba peel and 1h extraction time). In these extracts the following anthocyanins have been identified: delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside and peonidin-3-glucoside.

Key Words: Extraction, jabuticaba, anthocyanins.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Jabuticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i>).....	17
2.2 Flavonóides.....	19
2.3 Antocianinas.....	21
2.4 Antioxidantes.....	26
2.5 Métodos de Obtenção de Antocianinas a partir de Vegetais.....	28
2.5.1 Extração.....	28
2.5.2 Quantificação e Identificação de Antocianinas.....	31
2.5.3 Atividade Antioxidante.....	33
2.6 Considerações Finais.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Material Vegetal.....	36
3.2 Reagentes e Equipamentos.....	36
3.2.1 Reagentes.....	36
3.2.2 Soluções Tampão.....	36
3.2.3 Equipamentos.....	36
3.3 Estabilização do Material Vegetal.....	37
3.3.1 Liofilização.....	37

3.3.2 Maceração com Nitrogênio Líquido.....	37
3.4 Extração de Antocianinas Totais.....	38
3.4.1 Extração Convencional (maceração)	38
3.4.2 Extração Assistida por Ultrassom.....	39
3.5 Quantificação de Antocianinas.....	40
3.6 Atividade Antioxidante.....	41
3.7 Cinética de Extração.....	42
3.8 Identificação de Antocianinas.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Otimização dos Processos de Extração.....	43
4.1.1 Extração com Etanol.....	43
4.1.2 Extração com Metanol.....	47
4.2 Extração Assistida por Ultrassom.....	51
4.3 Atividade Antioxidante.....	54
4.3.1 Extratos Obtidos do Sistema Convencional.....	54
4.3.1.1 Extrato Etanólico.....	54
4.3.1.2 Extrato Metanólico.....	55
4.3.1.3 Maceração da casca com nitrogênio líquido e extração com metanol.....	57
4.3.2 Extratos Obtidos da Extração em Sistema Ultrassônico.....	58
4.3.2.1 Extrato Metanólico.....	58
4.3.2.2 Extrato da casca com nitrogênio líquido e extração com metanol.....	60
4.4 Cinética da Extração.....	61
4.5 Identificação de Antocianinas.....	63
5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	65
5.1 Conclusões.....	65
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química genérica dos flavonóides.....	21
Figura 2 - Estruturas dos principais flavonóides	21
Figura 3 - Estrutura do cátion flavílico.	22
Figura 4 - Mudanças estruturais das antocianinas em função do pH	25
Figura 5 – Processo da estabilização do composto DPPH.....	34
Figura 6 - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2 ³ da extração de antocianinas com etanol.....	45
Figura 7 - Aspecto dos espectros de absorção eletrônica das antocianinas (comprimentos de onda de 350 a 700 nm), obtidos o dos extratos etanólicos (pH 1,0 e 4,5) da casca de jabuticaba	46
Figura 8 - Curvas de contorno para extração de antocianinas em função de pH e temperatura (A) e pH e volume de metanol (B), respectivamente.....	49
Figura 9 - Aspecto dos espectros de absorção eletrônica das antocianinas (comprimentos de onda de 350 a 700 nm), obtidos dos extratos metanólicos (pH 1,0 e 4,5) da casca de jabuticaba	50
Figura 10 - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2 ³ da extração de antocianinas com metanol em sistema ultrassônico.	52
Figura 11 - Aspecto dos espectros de absorção eletrônica das antocianinas (comprimentos de onda de 350 a 700 nm), obtidos dos extratos metanólicos (pH 1,0 e 4,5) da casca de jabuticaba associado ao sistema ultrassônico.	53
Figura 12 - Curva de Calibração da Atividade Antioxidante (%) da Extração Convencional com Etanol.....	55
Figura 13 - Curva de Calibração da Atividade Antioxidante da Extração Convencional com Metanol.	56

Figura 14 - Curva de Calibração da Atividade Antioxidante de extrato metanólico obtido da extração convencional com metanol de cascas <i>in natura</i> maceradas com nitrogênio líquido.	58
Figura 15 - Curva de Calibração da Atividade Antioxidante do Extrato Metanólico obtido da extração em Sistema Ultrassônico.	59
Figura 16 - Curva de Calibração da Atividade Antioxidante do extrato metanólico obtidos do sistema ultrassônico de cascas <i>in natura</i> maceradas com nitrogênio líquido.....	61
Figura 17 - Cinética de extração de antocianinas totais em sistema convencional empregando metanol.....	62
Figura 18 - Cinética de extração de antocianinas totais em sistema ultrassônico empregando metanol.....	62
Figura 19 – Cromatografia por Camada Delgada (CCD) dos extratos antociânicos da extração convencional (A) e assistida por ultrassom (B).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis independentes e níveis estudados no planejamento fatorial 2^3 para extração de antocianinas totais por maceração (método convencional).....	38
Tabela 2. Variáveis independentes e níveis estudados no planejamento fatorial 2^2 para extração de antocianinas totais por ultrassom.	39
Tabela 3. Matriz do planejamento experimental 2^3 realizado com as respostas em termos de antocianinas totais em etanol.	44
Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) e resposta em termos de antocianinas totais, da extração com metanol.....	47
Tabela 5. Matriz do planejamento experimental 2^2 realizado com a resposta em termos de antocianinas totais extraídas com metanol e banho de ultrassom.	51
Tabela 6. Porcentagem da neutralização do DPPH do extrato etanólico obtido da extração convencional.....	54
Tabela 7. Porcentagem da neutralização do DPPH do extrato metanólico obtido do sistema convencional.	56
Tabela 8. Porcentagem da neutralização do DPPH do extrato metanólico de cascas maceradas com nitrogênio líquido.....	57
Tabela 9. Porcentagem da neutralização do DPPH do extrato metanólico obtido do banho de ultrassom.	59
Tabela 10. Porcentagem da neutralização do DPPH do extrato do banho de ultrassom de cascas maceradas com nitrogênio líquido.	60
Tabela 11. Antocianinas identificadas por cromatografia em camada delgada dos extratos metanólicos da casca de jabuticaba.	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Exemplos de Corantes Naturais.....	20
Quadro 2. Antocianinas encontradas em frutas.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - 2,2' - azinobis - 3 - etil - benzotiazolina - 6 - sulfônico

ANOVA - *Analysis of Variance* (Análise de Variância)

BAA - butanol:ácido acético:água

BHA - butil hidroxianisol

BHT - butil hidroxitolueno

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

DPPH - 2,2 - difenil - 1 - picril hidrazil

FE - Fase Estacionária

FM - Fase Móvel

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IC₅₀ - Concentração Inibitória para 50% das Células

F_R - Fator de Retenção

T_R - Tempo de Retenção

UV - Ultra Violeta

1 INTRODUÇÃO

A utilização de corantes na indústria de alimentos é prática comum, já que a cor e a aparência têm um papel decisivo na aceitação dos produtos pelo consumidor. Partindo dessa premissa, os corantes vem sendo empregados como forma de agregar valor comercial aos produtos.

Ainda frequente na indústria de alimentos, os corantes de origem sintética são utilizados pelas vantagens que eles apresentam, como menores custos de produção, maior estabilidade e capacidade tintorial. No entanto, ao longo dos anos, o número de aditivos sintéticos permitidos vem diminuindo devido às alterações orgânicas que a sua ingestão constante pode causar a seus consumidores (ALVES, 2011; LOPES et al., 2007).

No Brasil, em 1987, foi proibida a utilização de alguns corantes sintéticos na indústria, entre eles, o Amarelo Ácido, Azul de Indatreno, Vermelho Sólido E, Escarlata GN e Laranja GCN, restando permitido apenas o uso dos corantes Amarelo Crepúsculo, Azul Brillhante FCF, Bordeaux S ou Amarantho, Eritrosina, Indigotina, Ponceau 4R, Tartrazina e Vermelho 40. Com base nestes aspectos e devido à necessidade de substituir vários corantes artificiais, a indústria de alimentos recorreu a uma série de pigmentos naturais de origem vegetal e animal (LOPES et al., 2007).

Existe hoje uma grande demanda de pesquisas para desenvolver corantes alimentícios a partir de fontes naturais, visando diminuir e/ou eliminar, gradativamente, a dependência do uso de corantes alimentícios sintéticos no processamento de alimentos (FRANCIS, 1989).

Uma importante característica das plantas é a sua capacidade de sintetizar uma grande diversidade de compostos com baixo peso molecular, denominados metabólitos secundários, os quais se tornam essenciais para seu crescimento e reprodução, promovendo defesa contra agressões externas, como infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outras funções. Grande parte destes metabólitos são compostos fenólicos, que se encontram largamente distribuídos nas plantas e

constituem um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados da fenilalanina e tirosina, englobando desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização (OLIVEIRA, 2010). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que ocorrem naturalmente em plantas, dentre essa classe de compostos estão os flavonoides, grupo ao qual pertencem as antocianinas.

As antocianinas são consideradas os principais pigmentos naturais responsáveis pela coloração vermelha, azul e roxa de flores e frutos. As cores desenvolvidas, dependem, entre outros fatores, do pH do meio e da temperatura (TERCI, 2004). Além de serem fontes naturais de corantes para o segmento alimentício, as antocianinas também trazem possíveis benefícios à saúde devido ao seu potencial antioxidante.

Esse grupo de pigmentos são considerados como potenciais substitutos para os corantes sintéticos, devido às suas cores atrativas e também, em grande parte, pela sua solubilidade em água, características que fazem delas pigmentos interessantes para sua posterior incorporação em uma grande variedade de sistemas alimentícios (BORDIGNON-LUIZ et al., 2007).

Algumas frutas, como a jabuticaba, apresentam conteúdo significativo de antocianinas e considerável atividade antioxidante, sendo que tais compostos são encontrados em maiores proporções apenas em sua casca (CIPRIANO, 2011).

As novas perspectivas do uso de antocianinas como corantes é que ilustram a importância da pesquisa, como o desenvolvimento de processos de extração, quantificação e também identificação de antocianinas presentes nos extratos, visando, dessa forma, a obtenção de extratos padronizados.

Sendo assim, foi delineado como principal objetivo deste estudo, a otimização do processo extrativo de antocianinas presentes na casca dos frutos da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) e a avaliação da atividade antioxidante dos extratos obtidos nas diferentes condições de extração. Para tanto, alguns objetivos específicos também foram traçados:

- Avaliar a concentração de antocianinas nos extratos obtidos a partir de cascas de jabuticaba liofilizadas e *in natura* maceradas com nitrogênio líquido em diferentes solventes orgânicos;
- Avaliar os efeitos das variáveis temperatura, volume dos solventes e pH, na extração de antocianinas totais pelo método convencional (maceração);
- Empregar o sistema ultrassônico avaliando os efeitos da frequência e da temperatura;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos nas diferentes condições de extração;
- Identificar por Cromatografia de Camada Delgada as antocianinas dos extratos obtidos nas condições maximizadas de extração.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordadas, de forma sucinta, a fundamentação teórica necessária para o desenvolvimento do trabalho, apresentando tópicos sobre antocianinas e suas principais técnicas de extração, assim como aspectos analíticos e os sistemas estudados.

2.1 Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*)

Nativa do Brasil, a Jabuticabeira é conhecida desde o período do descobrimento. Sua fruta foi chamada pelos Tupis de *lapoti'kaba*, que quer dizer “fruta em botão”, numa referência à sua forma arredondada (CIPRIANO, 2011).

A espécie é encontrada de norte a sul do país, desde o Pará até o Rio Grande do Sul, mas é na região sudeste do país que tem maior ocorrência e produtividade. Tradicionalmente é cultivada como planta de fundo de quintal em pomares domésticos, sendo sua comercialização mais frequente em feiras de produtos coloniais (SILVA, 2012).

Frutífera pertencente à família *Myrtaceae*, floresce na primavera e no verão, produzindo grandes quantidades de frutos, os quais crescem em aglomerados no tronco e ramos (LIMA et al., 2008).

A jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), embora popular em todo o país, não chega a ter um alto valor comercial, por ser muito perecível, porém, tem sua venda assegurada. Apesar de ser grande a produção de uma única árvore, depois de colhida, a fruta tem uma vida útil de até três dias, o que prejudica a sua comercialização (SILVA, 2012).

Em virtude disto e entre outros aspectos, empresas nacionais estão comercializando a polpa da jabuticaba nas formas congelada e em embalagens assépticas, o que implica na geração de uma grande quantidade de resíduos de suas cascas (SILVA, 2012).

A espécie mais difundida no Brasil é a *Myrciaria cauliflora*, sendo que as principais variedades são a Sabará, mais apreciada, doce e intensamente plantada,

e a Paulista, cujos frutos são grandes e de maturação um pouco mais tardia (TORRES et al., 2011).

Existe muito pouca informação sobre a produção e a comercialização de jabuticaba no Brasil. Em 2008 foram comercializados 1.849.735 kg de jabuticaba, na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), sendo 95,6 % oriundos do próprio Estado. A comercialização de jabuticaba nas centrais de Abastecimento S.A. (CEASA) de outros estados totalizou 488.972 kg, sendo mais expressivo Vitória - ES, com 170.166 kg, Belo Horizonte - MG, com 126.126 kg e Curitiba - PR, com 108.609 kg (CIPRIANO, 2011).

Os frutos da jabuticabeira são classificados como baga, tem forma redonda ou arredondada, e, quando maduros, sua casca apresenta colorações roxa-escura ou preta. A polpa do fruto é branca, com leve acidez, doce e saborosa, com número de sementes podendo variar de uma a quatro (SASSO, 2009).

A jabuticaba é um fruto climatérico bastante interessante do ponto de vista nutricional, pois apresenta boa quantidade de niacina, ferro e antocianinas em sua composição. É rica em compostos fenólicos, apresentando aproximadamente 314 miligramas de antocianina por 100 gramas de fruto, porém esses pigmentos naturais estão presentes apenas na casca da fruta (TERCI, 2004).

Possuindo diversas finalidades, a jabuticaba também é utilizada para fins culinários e medicinais. Segundo Lima et al. (2008) sua casca é adstringente, sendo útil contra diarreia e irritações de pele, possuindo também indicações na medicina popular contra asma e outras doenças.

Tudo o que se pode fazer com a uva, pode-se da mesma forma fazer com a jabuticaba, que fornece ao consumidor produtos de qualidade, como: aguardente, compota, geléia, licor, sucos, xaropes (para preparo de sorvetes ou refrescos), vinagres e vinhos. A jabuticaba também é utilizada na fabricação de um extrato que serve como corante de vinhos e vinagres, substituindo outras fontes que são importadas (MANICA, 2000).

2.2 Flavonóides

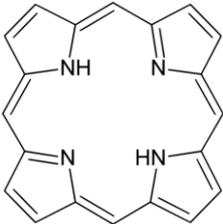
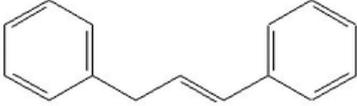
Os vegetais possuem dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Enquanto os metabólitos primários respondem pela sobrevivência do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes; os metabólitos secundários estão intimamente associados à estratégias de defesa das plantas. Além disso, por apresentarem atividade biológica contra herbívoros e microrganismos, por exemplo, muitos desses metabólitos são utilizados como inseticidas e fungicidas. Os principais metabólitos secundários são distribuídos em três grupos de acordo com a sua rota biossintética: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (SILVA et al., 2010).

Os metabólitos secundários diferem dos metabólitos primários por apresentarem distribuição restrita no reino vegetal. Isto significa que certos metabólitos secundários específicos são restritos à uma espécie vegetal ou à um grupo de espécies relacionadas, enquanto que os metabólitos primários, são encontrados em todo o reino vegetal (DOGENSKI, 2013).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que ocorrem naturalmente em plantas. Eles estão presentes em frutas, legumes, folhas, castanhas, sementes, flores e cascas de vegetais (SELLAPPAN et al., 2002). São classificados em pelo menos 10 grupos diferentes, dependendo da sua estrutura química e reatividade. Quimicamente, podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático ligado à um ou mais substituintes hidroxilas, incluindo seus derivados funcionais (CIPRIANO, 2011).

Dentre as classes de compostos fenólicos presentes em plantas e reconhecidos como componentes da dieta estão, principalmente, os flavonóides. A coloração das espécies vegetais pode ser atribuída a várias classes de substâncias, denominadas de agentes cromóforos, destacando-se entre elas as porfirinas, os carotenóides e os flavonóides (ALKEMA e SEAGER, 1982) (Quadro 1).

Quadro 1 - Exemplos de corantes naturais.

Classe	Grupo característico	Exemplos	Ocorrência
Porfirinas		Clorofila	Folhas verdes
Carotenóides		β -caroteno Licopeno	Cenoura, tomate
Flavonóides		Antocianinas Falvonóis	Maçã, framboesa Flores amarelas

Fonte: TERCI (2004).

O consumo humano diário de flavonoides varia de 6 a 64 mg, podendo chegar até 1 g por dia. Estes compostos, exclusivamente produzidos por vegetais, são geralmente encontrados em chás verdes, frutas, verduras, plantas medicinais, vinhos tintos e fitoterápicos. Mais de 400 flavonóides já foram estudados, sendo conhecidas suas estruturas e atividades biológicas (MIRANDA, 2000).

Em plantas, os flavonóides são encontrados ligados a açúcares como glicosídeos e são bastante estáveis. A Figura 1 apresenta uma estrutura genérica comum para a maioria dos flavonóides, os quais são diferenciados apenas por insaturações, hidroxilações e substituições (CAMPOS, 2006).

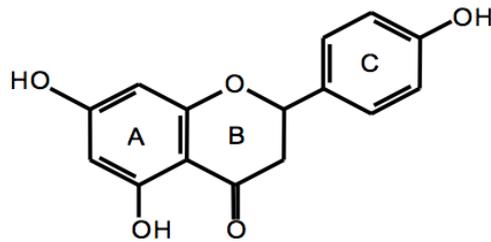


Figura 1 - Estrutura química genérica dos flavonóides. Os anéis A e C são aromáticos e o anel B é um heterociclo contendo oxigênio vizinho a um carbono ligado ao anel C.

Os principais agentes cromóforos de flores e frutos são os flavonóides. Estes compostos são subdivididos em 11 classes menores, sendo que as mais importantes são as flavonas, os flavonóis e as antocianinas (FAVARO, 2008; TERCI, 2004), cujas estruturas estão demonstradas na Figura 2.

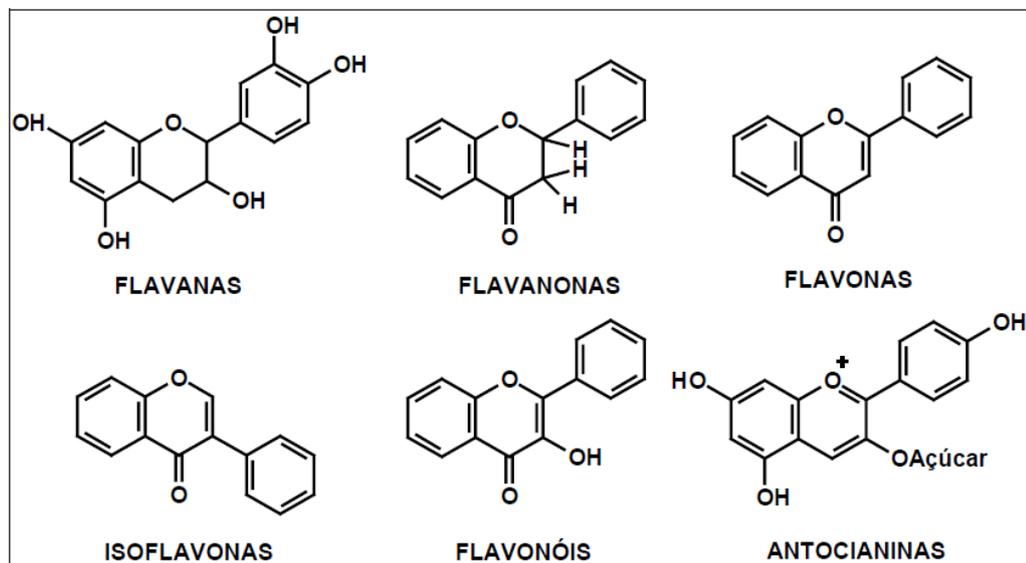


Figura 2 - Estruturas dos principais flavonóides

2.3 Antocianinas

As antocianinas pertencem à família dos flavonóides, compostos polifenólicos cujas propriedades biológicas vem sendo extensamente descritas na literatura.

Apesar da abundância de antocianinas na natureza, padrões comerciais são escassos e apresentam custo elevado (CAMPOS, 2006).

As antocianinas compreendem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal e são especialmente características das angiospermas ou plantas com flores, que proporcionam a nossa principal fonte de produção de alimentos. Em plantas alimentícias, as antocianinas são comuns em aproximadamente 27 famílias, 73 gêneros e uma infinidade de espécies (BRIDLE e TIMBERLAKE, 1997).

Segundo Schwartz et al. (2010) as antocianinas são responsáveis por diversas cores nas plantas, como azul, roxo, violeta, magenta, vermelho e laranja. A palavra antocianina deriva do grego: *anthos* (flor) e *kyanos* (azul).

Uma das principais funções das antocianinas em flores e frutas é o poder de atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes, além de proteger diversos tecidos da planta de processos oxidativos, durante diversas etapas de seu ciclo vegetativo, principalmente em fases iniciais de seu crescimento (HARBORNE, 1967).

As antocianinas são compostos polihidroxi e polimetoxi glicosados, cuja estrutura fundamental é o cátion flavílico, representado na Figura 3 (HARBORNE et al., 1975).

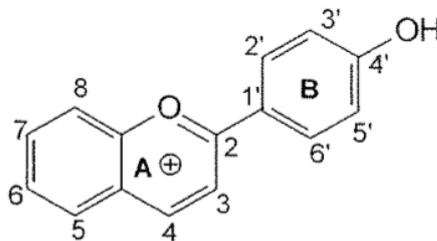


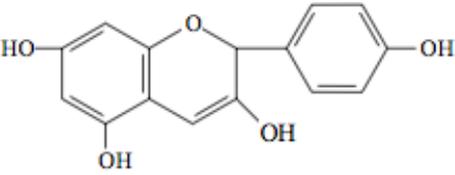
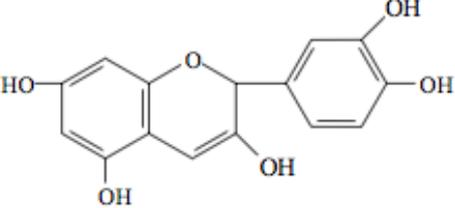
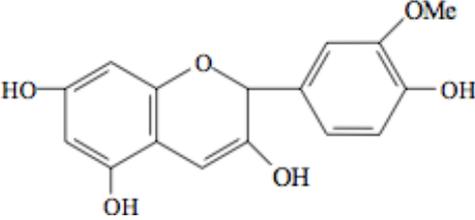
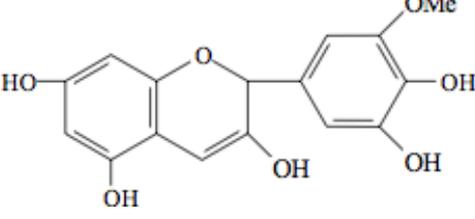
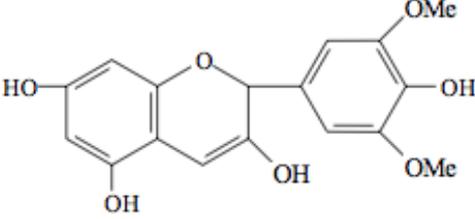
Figura 3 - Estrutura do cátion flavílico.

Essa classe de compostos ocorre naturalmente na forma heteroglicosídica, contendo duas ou três porções, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos (CIPRIANO, 2011).

Aproximadamente 22 agliconas são conhecidas, das quais 18 ocorrem naturalmente e apenas seis (pelargoidina, cianidina, delphinidina, peonidina,

petunidina e malvinidina) são importantes em alimentos (FRANCIS, 2000). Segundo Alves (2011), pelargoidinas são responsáveis pela coloração laranja, salmão, rosa e vermelho, enquanto que as cianidinas pela coloração vermelha e azulada e as delphinidinas, púrpura. No Quadro 2 são apresentados alguns exemplos de antocianinas frequentemente encontradas em frutas.

Quadro 2. Antocianinas encontradas em frutas.

Antocianinas	Estruturas	Fonte
Pelargonidina		Morango
Cianidina		Amora, ameixa, jambolão, uva, maçã
Peonidina		Jabuticaba, uva, ameixa
Petunidina		Uva
Malvinidina		Uva

Fonte: TERCI (2004).

A distribuição das seis mais comuns antocianidinas em diferentes partes de frutas e vegetais é: cianidina – 50 %, delphinidina – 12 %, pelargonidina – 12 %, peonidina – 12 %, petunidina – 7 % e malvinidina – 7 %. Os derivados glicosídicos mais frequentes na natureza são 3-monosídeos, 3-biosídeos, 3,5- e 3,7-diglicosídeos. A presença dos derivados 3-glicosídeo é 2,5 vezes mais frequente que os derivados 3,5-diglicosídeos e, por conseguinte, a antocianina mais comum é a cianidina-3-glicosídeo (KONG et al., 2003).

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonóides devido a sua característica de esqueleto carbônico $C_6C_3C_6$ (SCHWARTZ et al., 2010). São derivadas das antocianidinas, sendo que estas, não possuem grupos glicosídeos e a maioria é hidroxilada nas posições 3, 5 e 7. Já nas antocianinas, uma ou mais destas hidroxilas estão ligadas a açúcares, sendo os mais comuns: glicose, xilose, arabinose, ramnose, galactose ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares, aos quais podem estar ligados a ácidos fenólicos como: *p*-counário, cafeico, fenílico e vanílico. O açúcar presente nas moléculas de antocianinas confere maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos, se comparados com as antocianidinas (HARBORNE et al., 1975).

Diferentes grupos R e R' ligados nas posições 3, 5 e 7 e açúcares, assim como também os ácidos ligados à eles, é que vão dar origem aos diferentes tipos de antocianinas encontradas em frutas (TERCI, 2004). Segundo Alkema e Seager (1982), a coloração das soluções de antocianinas sofre influência do número de hidroxilas, grupos metoxilas e glicólicos presentes na estrutura. Então, quanto maior for o número de metoxilas, mais intensa será a cor vermelha; enquanto que mais hidroxilas e grupos glicólicos intensificam a cor azul.

Outros fatores também podem influenciar na coloração das soluções de antocianinas, tais como: presença de pequenas quantidades de outros pigmentos, quelação com metais, pH do fluído da célula vegetal e copigmentação com outros flavonóides (ALKEMA e SEAGER, 1982).

O principal mecanismo de estabilização das antocianinas em solução é a copigmentação, que pode envolver interações inter ou intramoleculares (MALIEN et al., 2001). As interações intermoleculares podem ocorrer por associação de duas ou mais moléculas de antocianina, envolvendo ou não um íon metálico. Também podem ocorrer por associação com outros compostos fenólicos, proteínas, açúcares,

ácidos nucleicos, ácidos orgânicos e minerais, aminoácidos, alcaloides e outros flavonóides. Todos esses fatores levam a uma proteção efetiva contra o ataque nucleofílico pela água, principalmente nas posições 2 e 4, sendo confirmada por espectros de RMN-H (FAVARO, 2008).

Dentro de cada grupo há muitos compostos diferentes, e sua cor depende da presença e do número de substituintes ligados à molécula (DAMODARAN, 2010). A Figura 4 apresenta as transformações estruturais das antocianinas em solução, com a mudança do pH do meio.

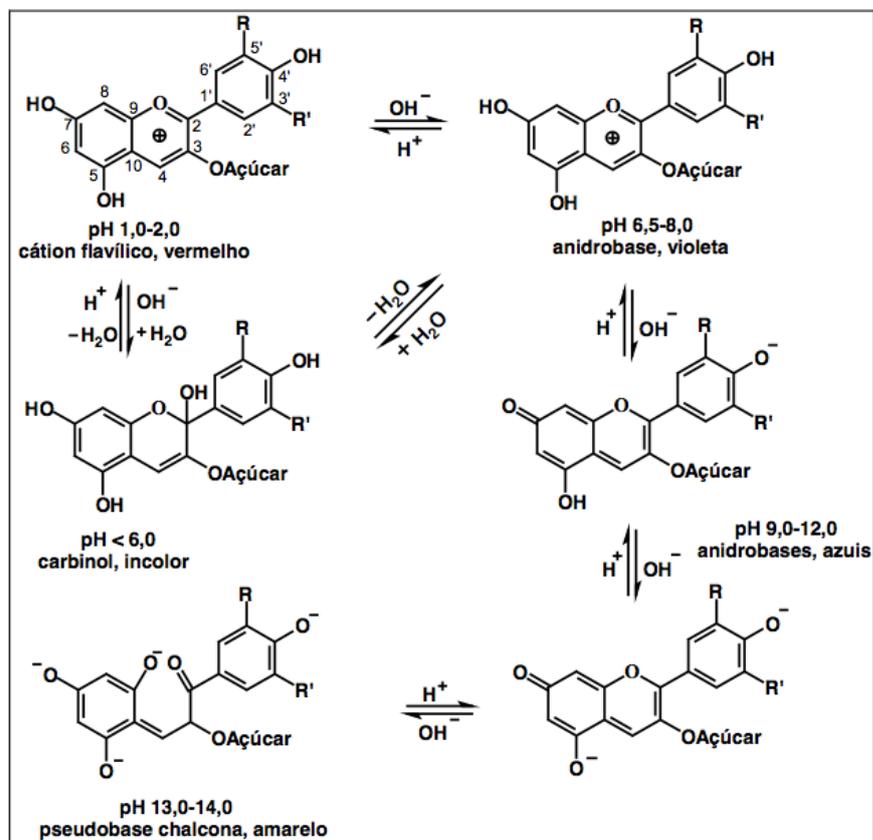


Figura 4 - Mudanças estruturais das antocianinas em função do pH

Fonte: Terzi (2004).

Elas são consideradas como potenciais substitutos para os corantes sintéticos, devido as suas cores atrativas e, em grande parte, pela sua solubilidade em água, características que fazem delas pigmentos interessantes para posterior incorporação em uma grande variedade de sistemas alimentícios (BORDIGNON-LUIZ et al. 2007).

No entanto, a estabilidade dessas moléculas pode ser afetada ainda por

diversos fatores além do pH, como a temperatura, sua estrutura química, concentração, luz, oxigênio, solventes, a presença de enzimas, outros tipos de flavonóides, proteínas e íons metálicos. A maior estabilidade de uma molécula de antocianina se dará em pH ácido, baixas temperaturas, baixa concentração de oxigênio, ausência de luz e baixa atividade de água (SCHWARTZ et al., 2010).

Devido à alta reatividade, as antocianinas facilmente podem se degradar, ocasionando a formação de compostos incolores ou de coloração marrom e produtos insolúveis (MAZZA e BROUILLARD, 1987).

O pH não só influencia a cor das antocianinas mas também a estabilidade delas. A estrutura básica das antocianinas na forma de cátion flavílico (AH^+) de cor vermelha é predominante em um pH inferior a 3; à medida que o pH aumenta o cátion perde um próton e sofre uma hidratação, formando uma pseudobase ou carbinol incolor em pH menor que 6; aumentando o pH acima de 6, o cátion flavílico perde prótons, formando a base quinoidal de cor azul; em pH 12 e 13 o carbinol se transforma por tautomerismo numa chalcona amarelo-pálida (ALVES, 2011).

2.4 Antioxidantes

As antocianinas são agentes corantes naturais, e, também, antioxidantes naturais. Além dos atributos de coloração proporcionados pelas antocianinas, o interesse no uso desses compostos tem sido intensificado devido a seus possíveis benefícios à saúde (FAVARO, 2008).

Os antioxidantes são compostos químicos com capacidade de reagir com radicais livres e assim restringir alguns efeitos maléficos que eles podem causar ao organismo. O corpo humano é capaz de produzir alguns antioxidantes endógenos, ou então, estes podem ser consumidos na dieta (PIMENTEL et al., 2005).

O oxigênio é altamente reagente com a maior parte das substâncias orgânicas, sejam elas naturais ou sintéticas. Sua alta reatividade é, então, um fator determinante para a manutenção da saúde humana assim como para a preservação dos alimentos. A peroxidação lipídica é uma das principais razões da deterioração de produtos alimentícios durante o processamento e estocagem. Uma forma de aumentar a validade destes produtos, especialmente os que contenham gordura, é a adição de antioxidantes (JAYAPRAKASHA et al., 2001).

Os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais, e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Em geral, antioxidantes sintéticos são compostos com estrutura fenólica com diferentes graus de substituição do radical alquila, enquanto antioxidantes naturais podem ser compostos fenólicos (tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos), compostos nitrogenados (alcalóides, derivados de clorofila, aminoácidos e aminas) ou carotenóides, assim como o ácido ascórbico (vitamina C) e a vitamina E. As restrições ao uso das mais diversas substâncias sintéticas em alimentos têm sido impostas por suspeitas de serem carcinogênicos. Sendo assim, o interesse por antioxidantes naturais, especialmente derivados de plantas, aumentou consideravelmente (OLIVEIRA, 2010).

A oxidação tem início pela presença de radicais livres, gerados por exposição ao calor, à luz ou a ações combinadas, seguido por reações de propagação (oxidação) levando à formação de radicais peróxido. O radical livre é uma molécula ou fragmento molecular que contém um ou mais elétrons desemparelhados quimicamente, e é esta valência livre que torna a molécula extremamente reativa e, fisicamente, este elétron desemparelhado torna a molécula paramagnética (GALATO, 2004).

Os mecanismos de atuação dos antioxidantes podem ser diferenciados, ou seja, podem consistir na inativação de radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução de hidropéroxidos para produtos incapazes de formar radicais livres ou produtos de decomposição (ARAÚJO, 2011).

Os organismos vivos estão constantemente sujeitos a reações de desequilíbrio que levam à formação de radicais livres, que, por sua vez, podem prejudicar a saúde humana, aumentando o risco de doenças crônicas não-transmissíveis, além de contribuir para o envelhecimento (BERTOLDI, 2006; BRENNAN e PAGLIARINI, 2001). Para impedir ou equilibrar esse tipo de dano celular, o organismo tem a proteção de enzimas endógenas (como superóxido dismutase, glutatona peroxidase, catalase, entre outras), capazes de catalisar reações para ocasionar a inativação de radicais livres. Muitas vezes, pode ocorrer grande desequilíbrio entre a produção e inativação de radicais livres, seja pela queda na capacidade do sistema enzimático ou pelo excesso de produção de espécies radicalares (CIPRIANO, 2011).

O excesso de radicais livres no organismo pode ser combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta, que protegem o sistema biológico contra os efeitos nocivos de processos ou reações que possam causar oxidação excessiva. O stress oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, e está envolvido no processo de envelhecimento (TONON, 2009).

NARAYAN et al (1999), descrevem que os antioxidantes derivados das antocianinas são altamente potentes se comparados, por exemplo, com antioxidantes clássicos como butilato hidroxil anisol, butilato hidroxil tolueno e alfa tocoferol (vitamina E). Este agente natural, quando adicionado à alimentos, além de conferir coloração, propicia também a prevenção contra auto-oxidação e peroxidação de lipídeos em sistemas biológicos (LOPES et al., 2007).

O uso de antocianinas como corante desperta grande interesse, mas, cada vez mais, um dos motivos que se destacam é a sua capacidade antioxidante, que chega a ser maior que da vitamina E, o butyl hidroxianisol (BHA) e o butyl hidroxitolueno (BHT). Por serem fortemente polares, podem substituir os antioxidantes lipofílicos como por exemplo, a vitamina E (ROCKENBACH, 2008).

2.5 Métodos de Obtenção de Antocianinas a partir de Vegetais

2.5.1 Extração

O crescente interesse na utilização de antocianinas como corante alimentício e em formulações de drogas e cosméticos tem destacado a necessidade do desenvolvimento e/ou aprimoramento de métodos analíticos para extração destes pigmentos obtidos a partir de espécies vegetais (TERCI, 2004).

A técnica de extração empregada para obtenção de extratos de produtos naturais influencia diretamente em sua qualidade e em sua composição final. O procedimento de extração é determinado por um conjunto de diversos fatores, mas principalmente, pela família de compostos a ser extraída e se o objetivo é quantitativo ou qualitativo. Os métodos de extração dependem de fenômenos de

difusão, logo, a renovação do solvente e a agitação são importantes para a eficácia e duração do processo (OLIVEIRA, 2010).

O método de extração mais utilizado para obtenção de antocianinas de frutas e hortaliças é por meio de solventes orgânicos (SILVA, 2011). A escolha de um método para extrair antocianinas vai depender, além do propósito de extração, da natureza dos constituintes das moléculas de antocianinas (JACKMAN e SMITH, 1996), sendo igualmente importante que tais métodos não sejam complexos, demorados ou de alto custo.

As antocianinas são geralmente muito solúveis em solventes polares e, portanto são facilmente extraídas utilizando água, metanol e etanol. Geralmente, a extração é realizada utilizando ácidos redutores, para prevenir a oxidação destes pigmentos (LEE e HONG, 1992).

Concomitantemente com os solventes alcoólicos, segundo Favaro (2008) o uso de ácidos favorece na extração, pois auxilia na penetração do solvente nos tecidos das frutas e vegetais, além de aumentar a estabilidade dos extratos por dificultar o aparecimento de fungos que degradam as antocianinas.

O meio ácido também faz com que as antocianinas se encontrem predominantemente na forma de cátion flavilium, o qual apresenta coloração vermelha em solução aquosa (REVILLA et al., 1998). O fato de o cátion flavílico ser estável em meio ácido torna indicável a utilização de solventes contendo ácidos orgânicos ou minerais na extração de antocianinas de frutas, como ácido clorídrico, fórmico e acético (CIPRIANO, 2011).

Outro fator que influencia na quantidade de antocianinas a ser extraída, é a temperatura de extração, que, para estes pigmentos, não deve exceder 60 °C, temperatura máxima na qual Terzi (2004), sugere que ainda são termicamente estáveis. Segundo Ju e Howard (2005), elevar a temperatura de extração facilita a liberação de antocianinas dos vacúolos celulares das frutas, aumentando assim a quantidade de antocianinas extraídas e reduzindo o tempo de extração.

Apesar da toxicidade, o metanol é o solvente mais utilizado para extração de antocianinas. Entretanto, para algumas aplicações dos extratos nas quais o aspecto

quantitativo não é o mais importante, e sim o qualitativo, etanol e água podem ser utilizados. A limitação do uso de etanol e água está relacionada com a menor eficiência na extração de antocianinas. Metanol é 20 % mais eficiente que etanol e 73 % mais eficaz que água (TERCI, 2004).

Um método alternativo às técnicas convencionais é a extração com banho de ultrassom. É uma técnica relativamente nova, que se baseia na utilização de energia das ondas sonoras transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva humana. Apesar de, inicialmente, ter sido desenvolvida para limpeza de materiais, atualmente vem sendo empregada numa ampla variedade de processos e produtos, devido à simplicidade da técnica e do equipamento (OLIVEIRA, 2010; TERCI, 2004).

Na indústria, dificilmente é aplicada como um processo isolado, mas, geralmente, como um coadjuvante, que auxilia no desempenho de outros processos para homogeneização e emulsificação de amostras, aceleração de reações, rompimento de estrutura celular e, conseqüentemente, tratamento de água e na extração de substâncias (OLIVEIRA, 2010).

A energia é irradiada verticalmente pelas ondas sonoras geradas na base do banho e são transmitidas através das paredes do vaso para o frasco com a mistura reacional. O banho de limpeza, a mais ampla fonte laboratorial disponível de irradiação ultrassônica, apresenta como vantagens uma melhor distribuição de energia através das paredes do vaso de reação e o fato de não requerer adaptação especial para o frasco reacional. Apresenta como desvantagens o fato de que a quantidade de energia fornecida para o frasco reacional não é facilmente quantificável, porque depende do tamanho do banho, do tipo de recipiente, da espessura das paredes do recipiente e da posição do frasco de reação no banho; o difícil controle da temperatura do sistema, porque o equipamento tende a aquecer quando usado por longos períodos; a temperatura do meio reacional é mais alta que a temperatura do líquido no banho; e não operarem na mesma frequência, pois cada fabricante produz equipamentos com frequências pré-determinadas (LUZ, 1998). Tais aspectos afetam os resultados particularmente quando se tem a tentativa de reproduzir os dados citados na literatura.

2.5.2 Quantificação e Identificação de Antocianinas

A quantidade de antocianinas presentes em frutas está relacionada a fatores climáticos, em particular à luz e à temperatura (MACHEIX et al. 1990). Assim, é difícil fazer uma comparação de diferentes culturas de uma mesma fruta e mais difícil ainda é fazer a comparação entre culturas e frutas diferentes (TERCI, 2004).

Há diversos métodos descritos na literatura para quantificar antocianinas (totais ou individuais), dentre os quais se destacam aqueles que envolvem: polarografia, colorimetria, espectrofotometria, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (FAVARO, 2008; TERCI, 2004).

Vale destacar que dados de composição de extratos antociânicos de frutas não são triviais, já que, para uma mesma espécie vegetal, os tipos e proporções de antocianinas presentes podem variar em função de vários fatores como o clima, época da colheita e característica do solo. Neste contexto, o método do pH diferencial para a quantificação de antocianinas totais representa uma das opções mais vantajosas (CAMPOS, 2006).

Aspectos quantitativos podem ser inferidos pelas características espectrais das antocianinas. A quantidade total de antocianinas em um extrato bruto contendo outros materiais fenólicos tem sido determinada principalmente por espectrofotometria, usando a medida da absorvância da solução num dado comprimento de onda. Isto é possível por que as antocianinas têm uma banda de absorção típica na região do visível, entre 490 e 550 nm. Esta banda está distante das bandas de absorção de outros compostos fenólicos, que apresentam uma absorção máxima na região do ultravioleta (FULEKI e FRANCIS, 1968).

Em muitos casos, um método simples pode sofrer interferências de produtos de degradação de antocianinas ou de reações de perda da coloração. Nestes casos, o método do pH diferencial e o subtrativo são os mais indicados para quantificar as antocianinas e seus produtos de degradação (TERCI, 2004).

O método do pH diferencial vem sendo amplamente utilizado para a quantificação de antocianinas. A proposta de Fuleki e Francis (1968) que fundamenta o método do pH diferencial está baseada na obtenção de espectros das soluções em dois valores de pH, visto que com a alteração do pH, observam-se transformações nas estruturas das antocianinas e, conseqüentemente, nas cores

das soluções onde estão contidas (Jackman et al., 1987). As leituras são feitas em dois comprimentos de onda, 510 nm, onde a absorção é máxima e 700 nm, que serve para corrigir eventuais espalhamentos de luz causados por partículas em suspensão, que de acordo com Fuleki e Francis (1968), podem estar presentes em extratos de frutas.

A identificação individual de antocianinas é possível com o uso de técnicas cromatográficas. Fatores de retenção (F_R) obtidos por cromatografia em placa ou papel – ou tempos de retenção (T_R), quando se utiliza cromatografia em coluna – obtidos experimentalmente são comparados com os reportados na literatura, guardadas as devidas limitações de cada procedimento. Há uma relação direta entre a estrutura da antocianina e sua mobilidade cromatográfica, sendo que a quantidade de grupos hidroxilas, bem como o grau de metilação, acilação e o número de unidades de açúcar ligadas à molécula, influenciam diretamente nos valores de retenção (JACKMAN et al., 1987). Segundo Goiffon et al. (1999), a mobilidade cromatográfica representada pelo valor de F_R ou T_R é a característica mais importante para se identificar uma antocianina.

Para a identificação de antocianinas em alimentos e plantas, dois procedimentos podem ser utilizados: comparação direta, quando há disponibilidade de material padrão, ou comparação indireta, se não houver material padrão. Neste caso, uma comparação cuidadosa com os dados da literatura é aceitável. A comparação indireta, embora seja um método sujeito a erros, é justificada pela falta de padrões e pelo trabalhoso procedimento para identificação de antocianinas (HARBORNE, 1998).

Como os alimentos são considerados uma matriz complexa, a cromatografia tornou-se uma etapa indispensável na análise dos mesmos, tanto para remover substâncias interferentes, como para separar os compostos de uma mesma família, possibilitando sua identificação individual (AUGUSTA, 2011).

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura complexa através do fracionamento desses componentes em duas fases que estão em contato íntimo. Uma delas permanece estacionária (FE), que pode ser um sólido, líquido ou gel; já a outra move-se através da FE, chamada de fase móvel (FM), que percola através de uma coluna em uma direção definida.

Durante a passagem da FM (geralmente um solvente orgânico, um gás inerte ou um fluido supercrítico), os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases, de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, de acordo com sua afinidade por ela e pela FM, o que resulta em migrações diferenciais dos diferentes componentes (CANUTO, 2011).

2.5.3 Atividade Antioxidante

Os vegetais, em particular as frutas, apresentam em sua constituição vários compostos com ação antioxidante, os quais incluem o ácido ascórbico, carotenóides e polifenóis. A quantidade e o perfil destes fitoquímicos variam em função do tipo, variedade e grau de maturação da fruta, bem como, as condições climáticas do cultivo (LEONG e SHUI, 2002). A eficácia da ação antioxidante vai depender ainda, da estrutura química e da concentração destes fitoquímicos no alimento (MELO et al., 2008).

Não existe um método satisfatório que consiga avaliar a atividade antioxidante total de uma amostra visto que ela depende da técnica utilizada, do tipo e concentração do substrato, dos constituintes presentes no extrato avaliado, parâmetros metodológicos como tempo e temperatura do ensaio, fenômeno de partição, fatores interferentes, dentre outros (BERTOLDI, 2006).

Segundo Robards (2003), os métodos espectrofotométricos *in vitro* mais usados são o ensaio do DPPH radical (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), o teste do branqueamento – caroteno e o método ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-sulfônico).

Para fins deste projeto, somente o método do DPPH será abordado. Tal método se baseia na habilidade redutora dos antioxidantes, presentes na amostra, sobre o DPPH, um radical orgânico estável, através de uma reação de transferência de elétrons, a qual é medida através do decréscimo da absorbância a 515 nm (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

O radical DPPH é considerado um radical estável à temperatura ambiente, produz uma solução violeta quando adicionado ao etanol e tem sua absorção máxima em 517 nm. Quando esse composto recebe um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar mais estável, sua absorção diminui. Esse processo pode ocorrer de duas maneiras: processo direto ou processo de transferência de elétron,

como apresentado na Figura 5 (OLIVEIRA, 2010):

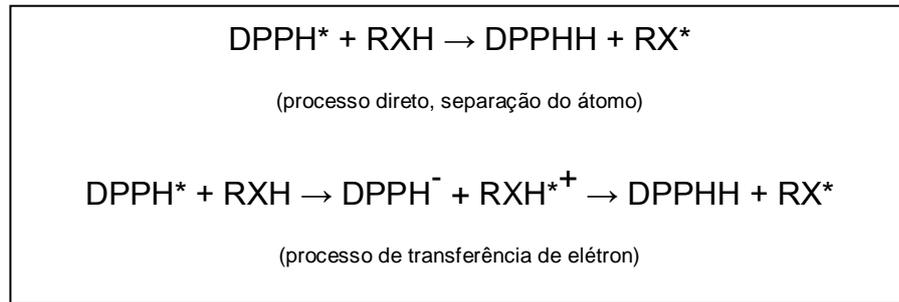


Figura 5 – Processo da estabilização do composto DPPH.

No processo direto o antioxidante (RXH) doa um hidrogênio para o radical DPPH*, tornando-o estável. Sendo o radical RX* relativamente estável, ele não reage com os lipídios. No processo de transferência de elétron, primeiramente um elétron é cedido para o radical DPPH* pela molécula do antioxidante e, em seguida, é cedido o hidrogênio, estabilizando o radical DPPH e formando o radical estável RX* (OLIVEIRA, 2010).

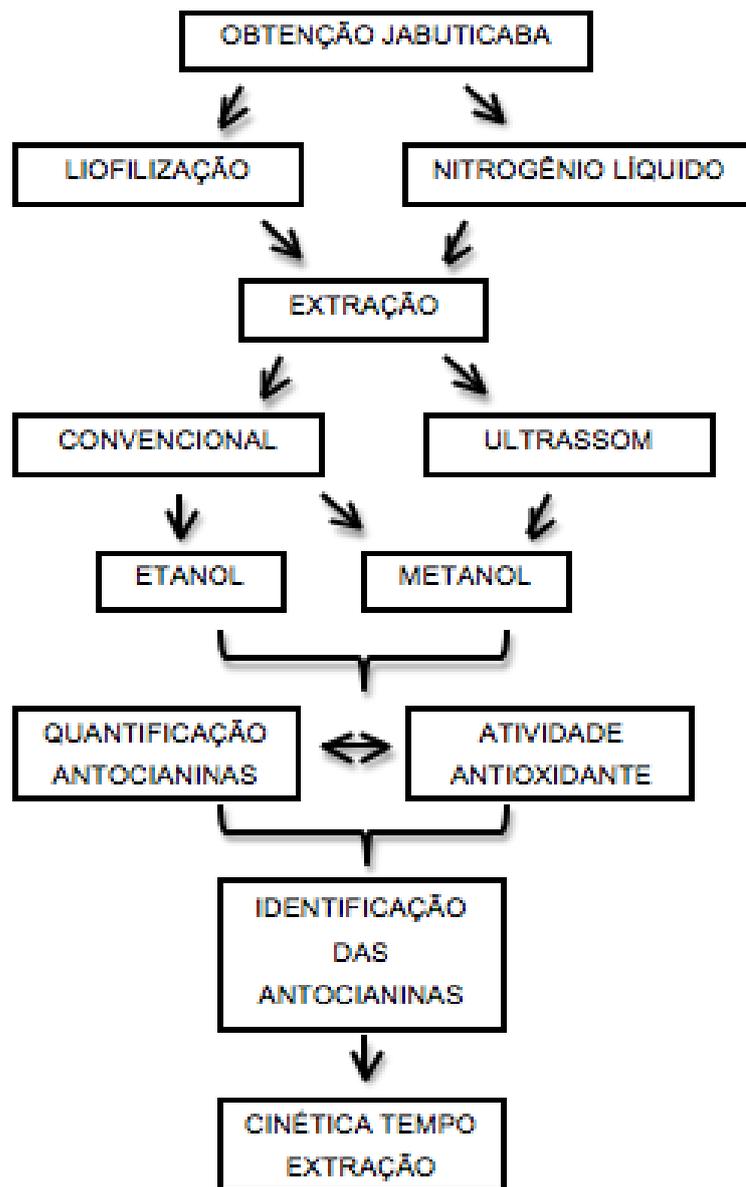
2.6 Considerações Finais

Considerando o quadro de escassez de fontes utilizadas comercialmente e a ampla distribuição desses compostos na natureza, torna-se necessário avaliar novas fontes de antocianinas, buscando vegetais de menor valor agregado e de fácil disponibilidade. A busca por novas fontes, investigando vegetais comumente encontrados pela população ou de consumo cotidiano, permite também informar acerca do teor de antocianinas presente nesses vegetais e incentivar o consumo baseado nos benefícios advindos da ingestão das antocianinas e seus antioxidantes.

Tomando como um conceito geral a otimização de processos extrativos em detrimento à crescente expansão do mercado de produtos naturais, objetiva-se extratos padronizados de antocianinas. A partir disso, alinham-se dois interesses distintos da sociedade atual: o reaproveitamento de resíduos industriais através de procedimentos seguros e que garantam a qualidade do produto; e o consumo de produtos compostos por ingredientes naturais que ofereçam benefícios à saúde humana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção estão demonstradas, através do esquema descritivo abaixo, as etapas seguidas ao longo dos experimentos realizados neste estudo.



3.1 Material Vegetal

Os frutos de Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) foram obtidos entre os meses de Dezembro de 2013 e Janeiro de 2014, de diferentes produtores da região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.

3.2 Reagentes e Equipamentos

3.2.1 Reagentes

Etanol (Química Moderna), Metanol (Química Moderna), Acetona (Vetec), Acetonitrila (Vetec), Ácido Clorídrico (Vetec), Hidróxido de Sódio (Vetec), Solução de DPPH (Sigma Aldrich), Hexano (Cinética), Butanol (Cinética), Ácido Acético (Vetec), Cloreto de Potássio (OHEMIS), Acetato de Sódio (Synth).

3.2.2 Soluções Tampão

- Tampão pH 1,0: Cloreto de potássio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 g) + ácido clorídrico $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (1,7 mL);
- Tampão pH 4,5: Acetato de sódio $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (16,5 g) + ácido clorídrico $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (1,7 mL).

3.2.3 Equipamentos

- Liofilizador Modulyo, Edwards;
- Embaladora à Vácuo 200B, Selovac;
- Freezer $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ MDF – U30865, Sanyo Ultra;
- pHmetro DM-22, Digimed;
- Shaker Incubadora 430 RDB, Nova Ética;
- Banho Ultrassom USC-1800A, Unique 3.8 L (Potência 132W);
- Centrífuga MPW-315R, Med. Instruments;
- Espectrofotômetro 8453E, Agilent Technologies;

3.3 Estabilização do material vegetal

Os frutos foram acondicionados e levados para o laboratório para serem despoldados, embalados à vácuo (-740 mmHg) em sacos de polietileno de baixa densidade (espessura de 10 micras) e congelados em freezer à 80 °C negativos.

3.3.1 Liofilização

A liofilização consiste em um processo de separação por sublimação, onde a água ou a substância aquosa é retirada como vapor do produto congelado passando da fase sólida para a fase gasosa (BORTOLATTO e LORA, 2011).

As cascas de jabuticaba foram retiradas do freezer e imediatamente distribuídas em bandejas do liofilizador, onde permaneceram sob abrigo de luz por 5 dias, atingindo assim, valores de umidade em torno de 10 %. Assim que retiradas do liofilizador, foram trituradas até apresentarem-se sob o aspecto de pó, oportunidade em que foram peneiradas em peneira de aço inox - ASTM 10 – MESH/TYLER 9 – Abertura 2 mm.

A conservação do material em pó foi feita sob temperatura ambiente (22 ± 2 °C) em frasco de vidro âmbar e sob abrigo da luz.

3.3.2 Maceração com Nitrogênio Líquido

As cascas de jabuticaba *in natura* foram retiradas do freezer e mergulhadas em hexano, por 40 segundos, para retirada das ceras epicuticulares (PAROUL *et al.*, 2009), facilitando na maceração das cascas com nitrogênio líquido. Após a maceração o material vegetal foi submetido à extração convencional e em banho de ultrassom.

3.4 Extração de Antocianinas Totais

3.4.1 Extração Convencional (maceração)

A extração convencional (maceração) foi feita fixando a massa da casca (liofilizada ou *in natura* macerada com nitrogênio líquido) em 10 g (base seca). Foram escolhidos dois tipos de solventes, etanol e metanol, acidificados com ácido clorídrico.

O efeito das variáveis independentes (volume do solvente = 100 a 250 mL, pH = 1 a 3 e temperatura de extração = 14 a 40 °C) foi avaliado, empregando-se um planejamento fatorial 2³, com triplicata no ponto central (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis independentes e níveis estudados no planejamento fatorial 2³ para extração de antocianinas totais por maceração (método convencional).

Variáveis Independentes*	Níveis		
	-1	0	1
Volume do solvente (mL)	100	175	250
pH	1	2	3
Temperatura (°C)	14	27	40

*Variáveis Independentes Fixas: tempo de extração (3 h), massa de casca liofilizada (10 g).

A extração foi realizada em agitador orbital (shaker) durante três horas e sob abrigo de luz.

Após este período, o extrato foi centrifugado (10 min – 4000 RPM) à temperatura ambiente e duas alíquotas de 10 mL foram retiradas, adicionadas em dois balões volumétricos de 50 mL e completados com solução tampão pH 1,0 e solução tampão pH 4,5, para posterior quantificação.

A variável dependente (resposta) foi a concentração de antocianinas totais expressa em mg de antocianina por 100 g de material vegetal liofilizado.

3.4.2 Extração Assistida por Ultrassom

O mecanismo para melhor extração utilizando ultrassom é atribuído ao comportamento das bolhas formadas pela cavitação na propagação das ondas, que acontece quando a pressão negativa resultante dos ciclos de expansão/compressão excede a tensão superficial do líquido naquele ponto. O colapso das bolhas produz efeitos que resultam no aumento da permeabilidade das paredes celulares, melhorando o processo de difusão e de transferência de massa (OLIVEIRA, 2010).

Ocorrendo a ruptura da parede celular, ocasionará a saída de compostos aromáticos da célula, além de aumentar a eficiência da extração e/ou redução do tempo de extração.

Na extração assistida por ultrassom, as variáveis independentes avaliadas foram frequência e temperatura de extração. A extração foi realizada somente com metanol acidificado com ácido clorídrico (pH 1), empregando 10 g de casca liofilizada e casca *in natura* macerada com nitrogênio líquido nas condições pré-determinadas no planejamento experimental fatorial 2^2 (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis independentes e níveis estudados no planejamento fatorial 2^2 para extração de antocianinas totais por ultrassom.

Variáveis Independentes*	Níveis		
	-1	0	1
Frequência (kHz)	16	28	40
Temperatura (°C)	14	27	40

*Variáveis Independentes Fixas: tempo de extração (1h), massa de casca (10g), volume de solvente (100mL).

A extração foi realizada em banho de ultrassom durante uma hora e sob abrigo de luz.

Após este período, os extratos foram centrifugados (10 min – 4000 RPM) à temperatura ambiente e duas alíquotas de 10 mL de cada um dos extratos foram retiradas, adicionadas em dois balões volumétricos de 50 mL e completados com solução tampão pH 1,0 e solução tampão pH 4,5 para posterior quantificação.

A variável dependente (resposta) foi a concentração de antocianinas totais expressa em mg de antocianina por 100g de material vegetal liofilizado.

3.5 Quantificação de Antocianinas

Os métodos diferenciais têm sido os mais utilizados na determinação quantitativa de antocianinas. Esses métodos se baseiam nas mudanças de absorvância resultantes da variação do pH das soluções e no fato das características espectrais dos produtos de degradação não serem alteradas por mudanças no pH (LEIDENS, 2011).

O conteúdo de antocianinas foi determinado utilizando o método do pH diferencial de Giusti e Wrolstad (2001), sendo as medidas de absorvâncias em 510 nm e 700 nm realizadas em pH 1,0 e pH 4,5 e expresso em mg de antocianina por 100 g de amostra.

Segundo Favaro (2008), a medida em 700 nm é introduzida, em alguns extratos de frutas, para corrigir efeitos de espalhamento da luz que ocorrem devido às suspensões coloidais; neste comprimento de onda a correção é tida como eficiente e não ocorre absorção de antocianinas.

A absorvância foi calculada a partir da equação 1:

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5} \quad (1)$$

A concentração de antocianinas no extrato foi calculada utilizando a equação 2:

$$C = \frac{(A \times M \times D \times 100)}{\epsilon \times L} \times \text{FD} \quad (2)$$

Onde: C – concentração de antocianinas (mg/100g); A – diferença de absorvância calculada na equação 1; M – massa molar da cianidina-3-glicosídeo = 449,2 g.mol⁻¹; D – diluição da leitura em espectrofotômetro; FD – fator de diluição; ε – absorvância molar = 26900 L.mol⁻¹.cm⁻¹; L – caminho óptico da cubeta = 1 cm.

3.6 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi apresentada em IC₅₀, definido como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50 %. Na presença de antioxidantes, o radical DPPH recebe um elétron (ou hidrogênio), tornando-se um composto mais estável. Assim, sua absorvância diminui. Esse processo pode ser visto a olho nu pela descoloração da solução de DPPH com extrato e através da utilização de um espectrofotômetro (OLIVEIRA, 2010).

Quanto menor o valor de IC₅₀, maior a atividade antioxidante do produto, ou seja, menor a quantidade de extrato que é necessária para inibir em 50 % a atividade dos radicais livres.

A metodologia foi fundamentada na medida da absorção do radical 2,2 difenil-1-picril hidrazil (DPPH) em 515 nm. A determinação da atividade antioxidante foi realizada por método espectrofotométrico. A técnica constitui na incubação, por 10 min, de 500 µL de soluto contendo concentrações crescentes da amostra (0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,25 ; 5 ; 7,5 ; 10 mg/mL em etanol. No controle utilizou-se 500 µL de DPPH. Para cada diluição foi preparado um branco, utilizando as diferentes concentrações de amostra com o solvente. O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos de porcentagem da atividade antioxidante (AA%) conforme equação 3:

$$AA\% = \frac{100 - (\text{Absorb. Amostra} - \text{Absorb. Branco})}{\text{Absorb. Controle}} \times 100 \quad (3)$$

Após a avaliação da faixa de concentração ideal, calculou-se a concentração de amostra necessária para capturar 50 % do radical livre DPPH (IC₅₀) por análise de regressão.

3.7 Cinética da Extração

Para determinar o menor tempo necessário para extração de antocianinas foi realizado um estudo cinético nas melhores condições experimentais determinadas nas etapas anteriores. As alíquotas de 1 mL foram retiradas durante a extração

(maceração e ultrassom) nos tempos 0,5 h; 1,0 h; 1,5 h; 2,0 h; 2,5 h; 3,0 h; 3,5 h; 4,0 h; 4,5 h e 5,0 h, onde avaliou-se a concentração de antocianinas em base seca. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.8 Identificação de Antocianinas

A identificação de antocianinas presentes nos extratos obtidos pelo método convencional e pela extração assistida por ultrassom foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) usando como eluente uma mistura de butanol:ácido acético:água (4:1:5 v/v/v), e a revelação foi feita com vapor de amônia, transformando a coloração em azul.

Os fatores de retenção (F_R) das antocianinas foram calculados pela razão entre a distância percorrida pelo pigmento e a distância total percorrida pela fase móvel (CAMPOS, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção estão relatados os resultados obtidos ao longo da pesquisa, complementados por gráficos gerados através de análise estatística das etapas de extração (convencional e em banho de ultrassom) e ensaios da capacidade antioxidante dos extratos. Ao final de cada procedimento, o conjunto de resultados é discutido em relação às observações obtidas neste experimento.

4.1 Otimização dos Processos de Extração

Dos solventes testados (acetona, acetonitrila, água, etanol e metanol), na etapa preliminar, os melhores resultados de antocianinas totais foram obtidos ao utilizar água, etanol e metanol com teores de 137, 169 e 435 mg/100 g em base seca, respectivamente. Desta forma, nas próximas etapas realizaram-se extrações com etanol e metanol.

4.1.1 Extração com Etanol

A Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) das variáveis e a resposta em termos de antocianinas totais (mg/100g) obtidas a partir da extração com etanol. Verifica-se que a condição experimental relativa à maior concentração de antocianinas totais (169 mg/100g) foi encontrada no ensaio 7 (volume de etanol de 100 mL, temperatura de 40°C e pH = 3,0). Estes resultados podem ser melhor visualizados pelo gráfico de pareto (Figura 6) que descreve os efeitos estimados das variáveis estudadas no planejamento fatorial, tratados estatisticamente.

Tabela 3. Matriz do planejamento experimental 2^3 realizado com as respostas em termos de antocianinas totais em etanol.

Ensaio	Variáveis Independentes*			Antocianinas (mg/100g)
	Volume (mL)	Temperatura (°C)	pH	
1	(-1) 100	(-1) 14	(-1) 1	115
2	(+1) 250	(-1) 14	(-1) 1	161
3	(-1) 100	(+1) 40	(-1) 1	114
4	(+1) 250	(+1) 40	(-1) 1	134
5	(-1) 100	(-1) 14	(+1) 3	40
6	(+1) 250	(-1) 14	(+1) 3	46
7	(-1) 100	(+1) 40	(+1) 3	169
8	(+1) 250	(+1) 40	(+1) 3	154
9	(0) 175	(0) 27	(0) 2	155
10	(0) 175	(0) 27	(0) 2	150
11	(0) 175	(0) 27	(0) 2	161

* Variáveis independentes fixas: tempo de extração (3 h) e massa de casca liofilizada (10g).

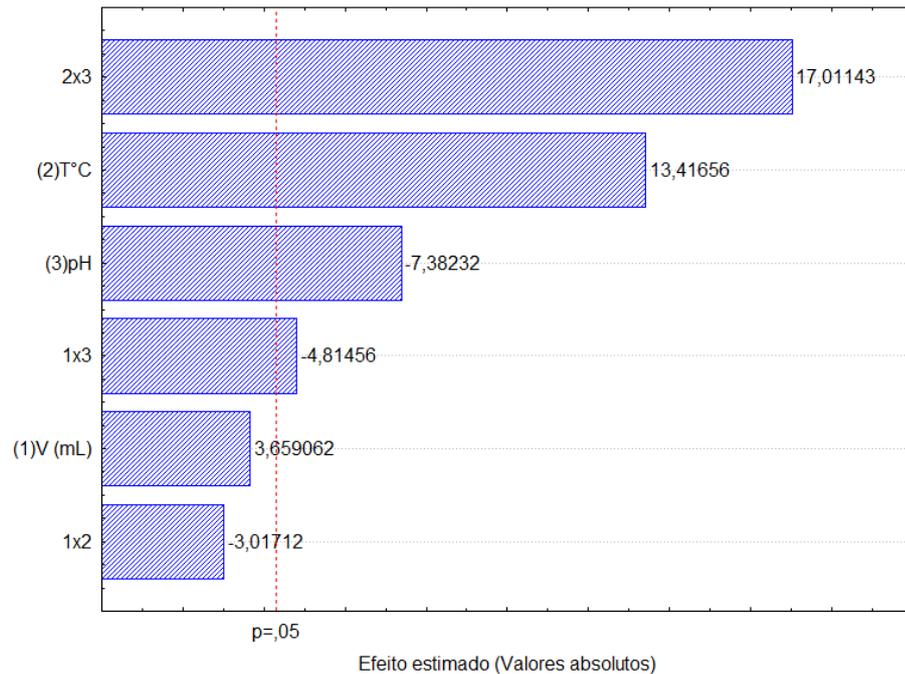


Figura 6 - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2^3 da extração de antocianinas com etanol

Observou-se que em 3 horas de extração por maceração a temperatura e o pH apresentaram efeitos significativos, sendo que a temperatura apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) positivo e o pH negativo.

O efeito negativo encontrado para o pH indica que um deslocamento do nível de pH estudado para valores inferiores, resultaria em um aumento da concentração de antocianinas totais. Como o nível inferior (-1) é o pH de 1,0, esta variável foi fixada no menor valor, pois valores inferiores a esse podem resultar, segundo Revilla et al. (1998), em hidrólise parcial das antocianinas aciladas e, conseqüentemente, na estimacão incorreta do total de antocianinas.

A temperatura é outro fator importante relacionado à estabilidade das antocianinas porque à medida que se submete a solução de antocianinas à uma temperatura significativamente superior à ambiente (25 °C), a sua degradação é maior. A estabilidade das antocianinas frente à temperatura é influenciada pelo grau de acilação (LOPES et al., 2007). Em estudo sobre a estabilidade das antocianinas em vinhos, Van Buren et al. (1968), relatam que os vinhos que continham pigmento acilado mantiveram sua cor inalterada numa temperatura de até 50 °C.

Lima et al., (2011), utilizando-se de maceração com etanol acidificado (HCl), estudou duas variedades de jabuticaba, encontrando 159 e 206 mg/100 g (base seca) nas variedades Paulista (*Myrciaria cauliflora*) e Sabará (*Myrciaria jabuticaba*), respectivamente. Kato et al. (2012), em sistema convencional com etanol 60%, acidificado com HCl até pH 2, obteve resultado igual a 203,67 mg/100 g para antocianinas encontradas na uva (*Vitis vinifera* L.). Para cascas de jabuticaba (*Myrciaria* spp.) *in natura*, também em extração com etanol acidificado (HCl) e temperatura em torno de 30 °C, Silva et al. (2010), relata valor de 48,06 mg/100 g de conteúdo antociânico total.

Essas variações podem ser explicadas em razão das diferentes condições de extração envolvidas, desde o solvente extrator utilizado, pH, temperatura, tempo de extração e a relação da utilização de casca seca ou *in natura*, até mesmo, as diferentes regiões e safras de colheitas da jabuticaba.

Na Figura 7, está representada a leitura em espectrofotômetro da melhor condição da extração convencional com etanol, confirmando a maior absorbância em 510 nm, sendo que a faixa avaliada foi de 350 a 700 nm.

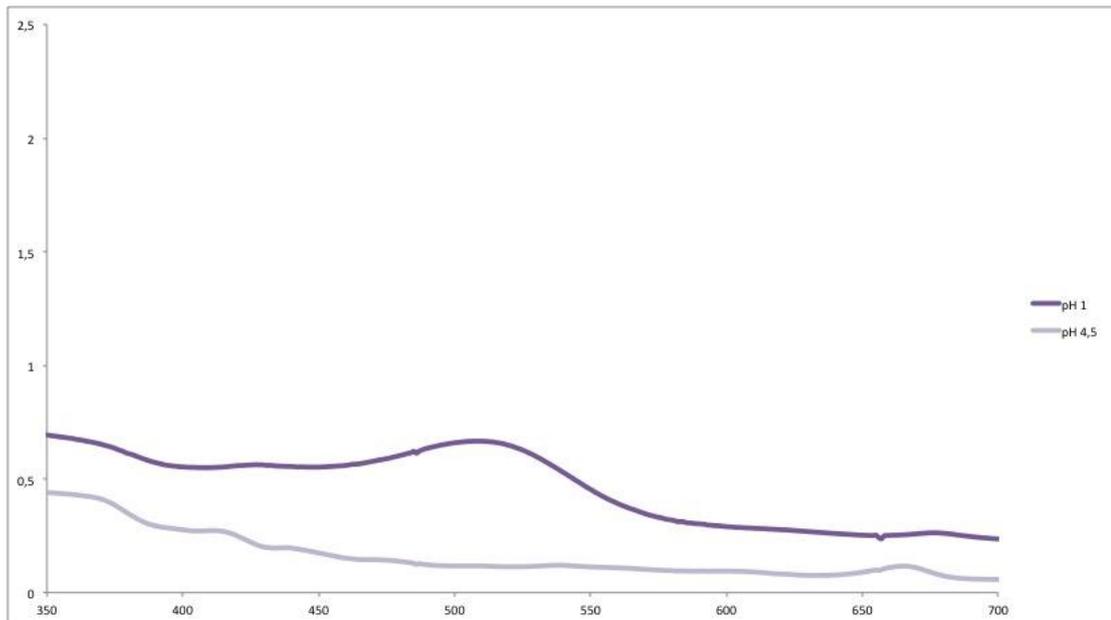


Figura 7 - Aspecto dos espectros de absorção eletrônica das antocianinas (comprimentos de onda de 350 a 700 nm), obtidos o dos extratos etanólicos (pH 1,0 e 4,5) da casca de jabuticaba .

Segundo Terzi (2004), o espectro de absorção eletrônica das antocianinas é caracterizado por duas bandas separadas, uma na região do visível (465 nm a 550 nm) e outra na região do ultravioleta (270 nm a 280 nm). No espectro demonstrado pela Figura 7, essas absorções características podem ser observadas, em 510 nm, indicando a presença deste grupo de pigmentos nos extratos etanólicos de jabuticaba.

4.1.2 Extração com Metanol

A Tabela 4 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) das variáveis e a resposta em termos de antocianinas totais (mg/100 g) obtidas a partir da extração com metanol. De acordo com a Tabela 4, o teor de antocianinas dos extratos metanólicos variou de 274 a 435 mg/100 g de casca de jabuticaba em base seca. Conforme relatado na literatura (TERCI, 2004), a utilização de metanol proporcionou maiores teores de antocianinas, quando comparado à extração com etanol (Tabela 3).

Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) e resposta em termos de antocianinas totais, da extração com metanol.

Ensaio	Variáveis Independentes*			Antocianinas
	Volume (mL)	Temperatura (°C)	pH	mg/100g
1	(-1) 100	(-1) 14	(-1) 1	368
2	(+1) 250	(-1) 14	(-1) 1	341
3	(-1) 100	(+1) 40	(-1) 1	435
4	(+1) 250	(+1) 40	(-1) 1	407
5	(-1) 100	(-1) 14	(+1) 3	292
6	(+1) 250	(-1) 14	(+1) 3	274
7	(-1) 100	(+1) 40	(+1) 3	325
8	(+1) 250	(+1) 40	(+1) 3	295
9	(0) 175	(0) 27	(0) 2	375
10	(0) 175	(0) 27	(0) 2	338
11	(0) 175	(0) 27	(0) 2	372

* Variáveis independentes fixas: tempo de extração (3 h) e massa de casca liofilizada (10g).

A partir da Tabela 4 pode ser observado que a melhor resposta em termos de extração de antocianinas (435 mg/100 g), foi obtida no ensaio 3 (volume de metanol = 100 mL, temperatura = 40 °C e pH = 1).

Os resultados da Tabela 4 foram tratados estatisticamente e os efeitos absolutos estão apresentados na forma de Gráfico de Pareto (Apêndice I). A única variável independente que apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) e negativo, dentro da faixa estudada, foi o pH, segundo análise do gráfico de pareto (Apêndice I).

Soares et al. (2008), em estudo sobre as antocianinas contidas na casca da uva (Niágara e Isabel) trabalhando com extração metanólica e acidificada (HCl), também utilizando o método do pH diferencial, encontrou teores de antocianinas variando de 7,02 e 82,15 mg/100g (base fresca) e 47,65 até 214 mg/100 g de antocianinas em base seca para as duas variedades estudadas.

Para um extrato obtido da fruta fresca de jaboticaba, com metanol, acetona e água, o teor de antocianinas encontrado foi de 440 mg/gGAE (gramas equivalentes a ácido gálico) (RUFINO et al., 2010). Teixeira et al. (2008), em comparação de métodos para quantificação de antocianinas em diferentes frutas, relataram um conteúdo de 492 mg/100 g de antocianinas na casca da jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*), valor semelhante ao obtido no presente estudo (Tabela 4, ensaio 3), de 435 mg/100 g, também em extração utilizando metanol acidificado.

Terci (2004) destaca que a jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) é uma fruta que contém alto teor de antocianinas e que é preciso considerar que os pigmentos naturais estão presentes apenas na casca da fruta, enquanto que, quando comparadas a outras espécies, como o jambolão (386 mg/100 g), a amora (290 mg/100 g) e a uva (227 mg/100 g), as substâncias são encontradas, também, na polpa.

Através da análise de variância (Apêndice I) verificou-se que o coeficiente de correlação obtido de 0,95 e o F calculado de 3,55 vezes maior que F tabelado, permitiram validar estatisticamente ($p < 0,05$) o modelo (Equação 4) e a construção de curvas de contorno, apresentados na Figura 8. Os parâmetros não significativos foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância (ANOVA).

$$\text{Concentração de antocianinas totais (mg/100g)} = 347,44 - 45,75(\text{pH}) \quad (4)$$

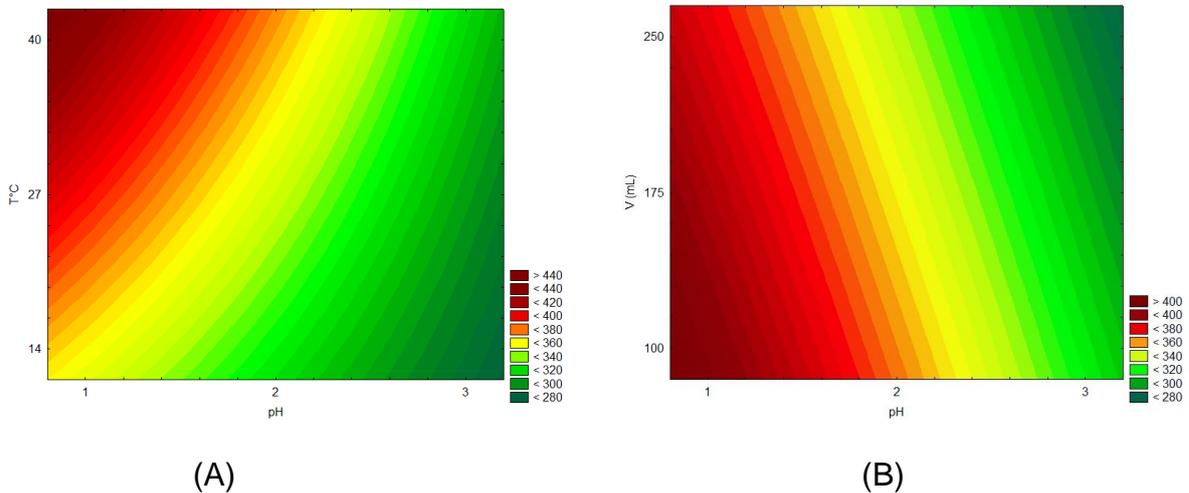


Figura 8 - Curvas de contorno para extração de antocianinas em função de pH e temperatura (A) e pH e volume de metanol (B), respectivamente.

Como pode ser observado na Figura 8, valores de pH mais baixos (~1,0) e temperaturas próximas a 40 °C (Figura 8A) levam a uma maior extração de antocianinas no extrato metanólico. Pode-se observar ainda, que, níveis inferiores de pH e volume de metanol (Figura 8B) maximizam a extração de antocianinas.

Considerando que os valores de pH alteram o espectro de UV dos extratos, Bordignon et al. (2009), realizaram em seus estudos, leituras com o intuito de verificar a influência do valor do pH da solução extrativa no teor de antocianinas totais. Evidenciaram que a solução extrativa em pH 1,0 foi a mais eficiente para extração de antocianinas em frutos de morangueiro (*Fragaria x ananassa*), já que os valores de absorbância foram significativamente superiores aos demais. Em pH 1, o teor de antocianinas encontrado foi de 76,60 mg/100 g, enquanto que em pH 4,5 foi de apenas 7,48 mg/100 g.

Silva (2011), encontrou teores máximos de antocianinas em extrações com solução metanólica de 60 % à 80 % associadas a valores baixos de pH, ou seja, pH mais ácido. Concluindo que a redução do pH poderia se elevar a extração de

antocianinas, compostos fenólicos e atividade antioxidante dos sistemas e confirmando o efeito significativo do pH na extração destes compostos.

Na extração convencional realizada com as cascas *in natura* maceradas em nitrogênio líquido, encontrou-se valores de 328 mg/100 g para quantificação de antocianinas. Mesmo apresentando valores inferiores aos obtidos com a casca liofilizada, os resultados são similares ou superiores aos encontrados na literatura (CAMPOS, 2006; TERCI, 2004; TEIXEIRA, 2008).

Na Figura 9, está representada a leitura em espectrofotômetro da melhor condição da extração convencional com metanol, confirmando a maior absorbância em 510 nm, sendo que, a faixa estudada foi de 350 a 700nm.

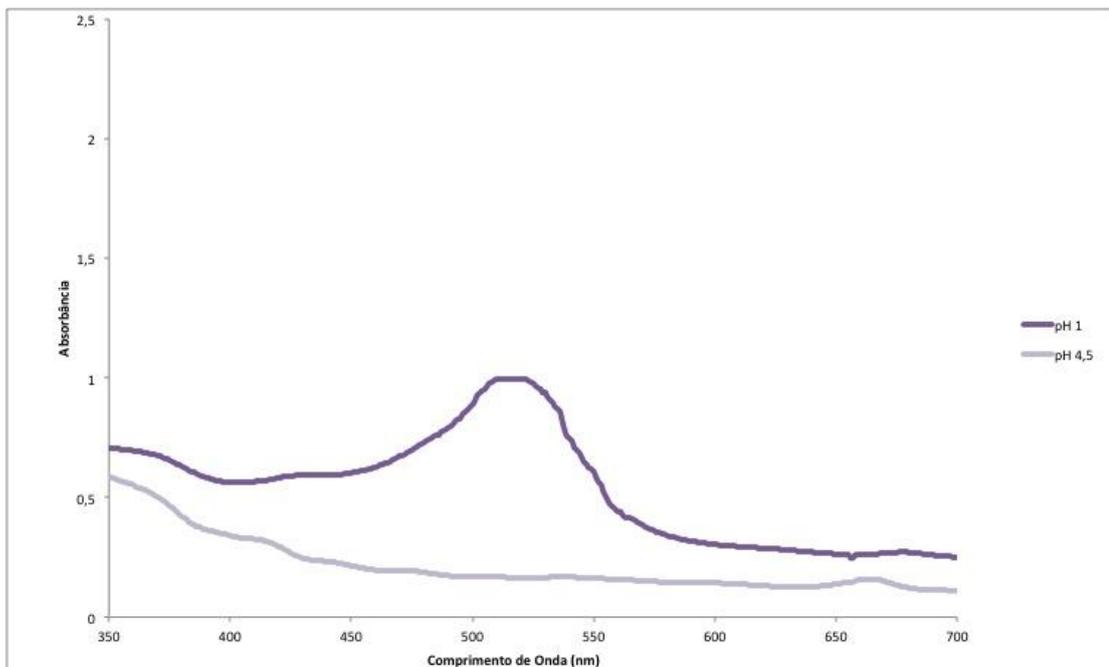


Figura 9 - Aspecto dos espectros de absorção eletrônica das antocianinas (comprimentos de onda de 350 a 700 nm), obtidos dos extratos metanólicos (pH 1,0 e 4,5) da casca de jabuticaba .

Sondheimer e Kertz (1948), observaram que antocianinas dissolvidas em meio alcoólico apresentam espectros diferentes dos daquelas dissolvidas em meio aquoso. Em seus estudos com morangos, eles observaram que, em meio alcoólico, o $\lambda_{m\acute{a}x}$ das antocianinas de seus extratos estava aparecendo em 520 nm, enquanto que em meio aquoso em 500 nm.

4.2 Extração Assistida por Ultrassom

A Tabela 5 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^2 (valores reais e codificados) das variáveis (frequência = 16 a 40 kHz e temperatura = 14 a 40 °C) e a resposta em termos de antocianinas totais (mg/100 g) obtidas da extração com metanol em sistema ultrassônico. Baseando-se nos resultados obtidos a partir da extração convencional, o volume do solvente metanol foi fixado em 100 mL, quantidade de casca liofilizada de 10 g, tempo de extração de 1 hora e o pH = 1,0 .

Tabela 5. Matriz do planejamento experimental 2^2 realizado com a resposta em termos de antocianinas totais extraídas com metanol e banho de ultrassom.

Ensaio	Variáveis Independentes*		Antocianinas (mg/100g)
	Frequência (Khz)	Temperatura (°C)	
1	(-1) 16	(-1) 14	147
2	(+1) 40	(-1) 14	172
3	(-1) 16	(+1) 40	251
4	(+1) 40	(+1) 40	354
5	(0) 28	(0) 27	169
6	(0) 28	(0) 27	179
7	(0) 28	(0) 27	160

* Variáveis independentes fixas: volume de solvente (100 mL), pH (1,0), tempo de extração (1 h) e massa de casca liofilizada 10 g.

De acordo com a Tabela 5, o teor de antocianinas obtidas dos diferentes ensaios variou de 147 a 354 mg/100 g nas cascas de jabuticaba em base seca. Na extração com ultrassom, o maior valor de antocianinas totais encontrado foi de 354 mg/100 g, inferior ao encontrado na extração convencional, mas em um menor tempo de extração, apenas uma hora. Valores similares (367 mg/100 g) foram reportados por Santos (2010), com cascas de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) e utilizando banho de ultrassom.

Chen *et al.* (2007), testaram o ultrassom na extração de antocianinas em framboesa, os resultados obtidos sugeriram que o tempo de extração e o poder ultrassônico possuem efeito significativo no total de antocianinas. Com o uso do ultrassom, conseguiram reduzir significativamente o tempo de extração, em relação ao método convencional, obtendo resultados semelhantes e/ou o mesmo conteúdo de antocianinas.

Os resultados da extração de antocianinas em ultrassom mostrados na Tabela 5 foram tratados estatisticamente e estão apresentados na forma de Gráfico de Pareto (Figura 10).

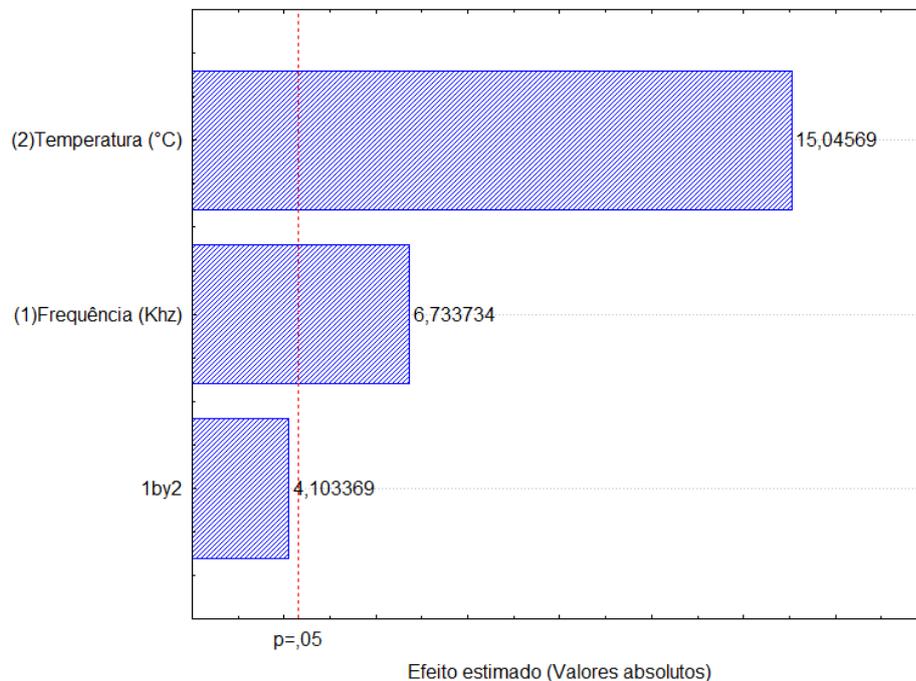


Figura 10 - Gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2^3 da extração de antocianinas com metanol em sistema ultrassônico.

Como pode ser observado na Figura 10, tanto a temperatura como também a frequência têm interferência significativa ($p < 0,05$) e positiva no teor de antocianinas extraídas com metanol em sistema ultrassônico, mostrando que aumentando estas duas variáveis maximizaria o processo extrativo, no entanto, a frequência máxima atingida pelo banho de ultrassom utilizado é de 40 kHz.

Em síntese, quando o procedimento extrativo é realizado com casca *in natura* macerada em nitrogênio líquido, o máximo valor obtido foi de 345 mg/100 g e ao

comparar com a extração convencional (328 mg/100 g), o rendimento é similar, porém o sistema ultrassônico apresenta vantagem em função do menor tempo de extração.

Na Figura 11, está representada a leitura em espectrofotômetro da melhor condição da extração ultrassônica com metanol, onde a faixa estudada foi de 350 a 700 nm, mostrando a maior absorbância em 510 nm.

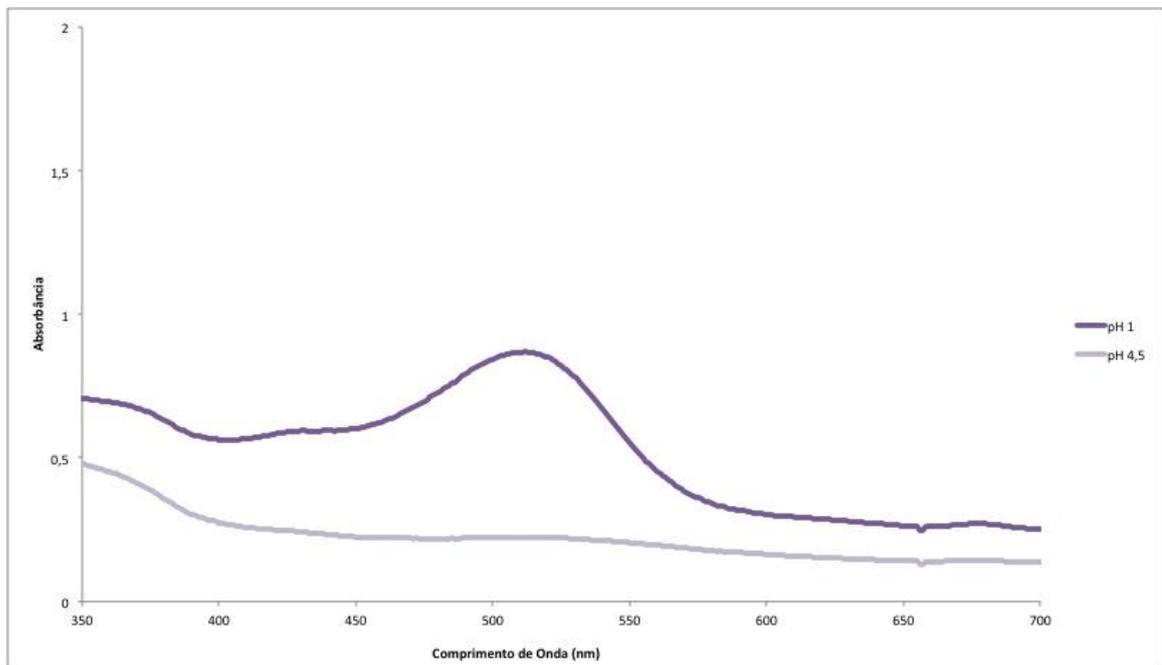


Figura 11 - Aspecto dos espectros de absorção eletrônica das antocianinas (comprimentos de onda de 350 a 700 nm), obtidos dos extratos metanólicos (pH 1,0 e 4,5) da casca de jabuticaba associado ao sistema ultrassônico.

Neste estudo, os espectros obtidos em espectrofotômetro tem fins apenas de demonstrar os picos de absorbância máxima de antocianinas, em extratos alcoólicos e/ou metanólicos, em cada condição extrativa. Favaro (2008), testou a quantificação direta de antocianinas individuais a partir de medidas de absorbância em UV-VIS, obtendo indicações sobre as estruturas das antocianinas, através de padrões comerciais.

4.3 Atividade antioxidante

4.3.1 Extratos obtidos do Sistema Convencional

4.3.1.1 Extrato Etanólico

Os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do extrato com etanol em diferentes concentrações estão representados na Tabela 6. Os valores encontrados demonstram que o percentual antioxidante do extrato com etanol aumenta proporcionalmente às diferentes concentração adicionadas, atingindo o valor máximo de 39 % de atividade antioxidante para a concentração de 2,5 mg/mL.

Tabela 6. Porcentagem da neutralização do DPPH do extrato etanólico obtido da extração convencional.

Concentrações (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)
0,075	4,3
0,1	5,6
0,25	6,7
0,5	8,5
0,75	12,3
1	19,7
2,5	38,7

Após a identificação da faixa de concentração com aumento linear em relação à atividade antioxidante, traçou-se a equação da reta e determinou-se o IC₅₀ do extrato etanólico obtido do sistema convencional, como mostra a Figura 12.

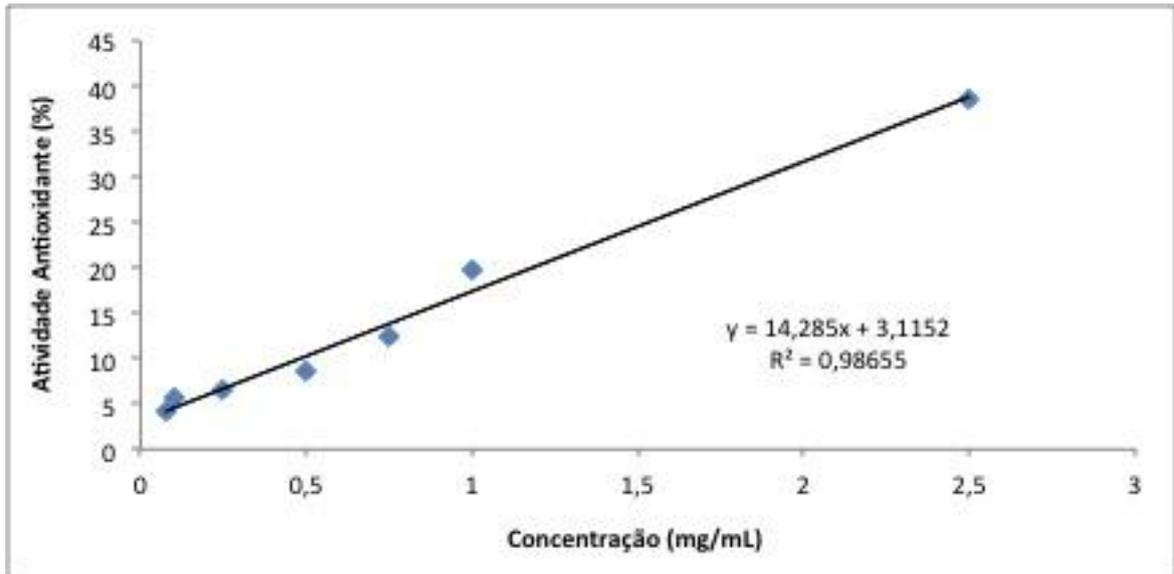


Figura 12 - Curva de Calibração da Atividade Antioxidante (%) da Extração Convencional com Etanol.

A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração utilizada ($Y = 14,285x + 3,1152$) com $R^2 = 0,98655$ forneceu um IC_{50} de $0,3 \text{ mg}/\mu\text{L}$ para o extrato obtido através da extração convencional com etanol.

Katalinić et al. (2010) a partir de um extrato de casca de uva *Merlot* seca obtido de uma extração convencional com solução etanol/água teve resultados de IC_{50} de $0,2 \text{ mg}/\mu\text{L}$. Já Campos et al. (2008), apresentaram valores de IC_{50} de $0,5 \text{ mg}/\mu\text{L}$ para extrato Soxhlet de bagaço desidratado de *Cabernet sauvignon*.

4.3.1.2 Extrato Metanólico

Os valores que foram obtidos com a determinação da atividade antioxidante do extrato de metanol em diferentes concentrações estão representados na Tabela 7. Os resultados demonstram que o percentual antioxidante do extrato com metanol aumenta proporcionalmente às diferentes concentração adicionadas, atingindo o valor máximo de 93% de atividade antioxidante para a concentração de $2,5 \text{ mg}/\text{mL}$.

Tabela 7. Porcentagem da neutralização do DPPH do extrato metanólico obtido do sistema convencional.

Concentrações (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)
0,25	18,7
0,5	33,2
0,75	47,0
1	54,4
2,5	92,9

Após a identificação da faixa de concentração com aumento linear em relação a atividade antioxidante, traçou-se a equação da reta e determinou-se o IC₅₀ do extrato metanólico, como mostra a Figura 13.

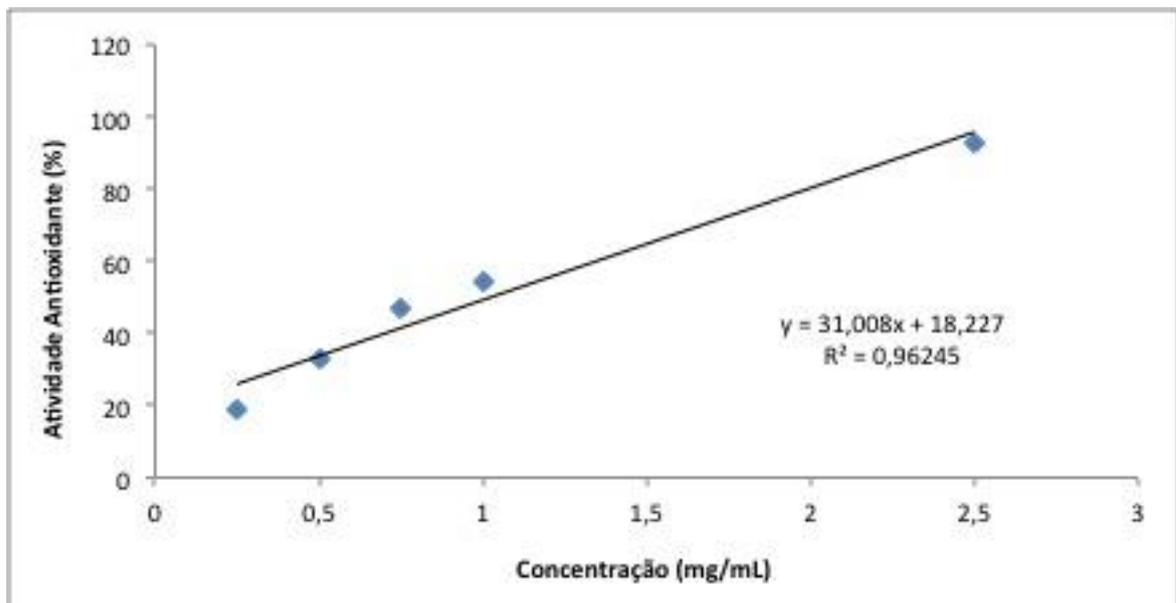


Figura 13 - Curva de Calibração da Atividade Antioxidante da Extração Convencional com Metanol.

A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração utilizada ($Y = 31,008x + 18,227$) com $R^2 = 0,96245$ forneceu um IC₅₀ de 0,1 mg/ μ L para o extrato obtido através da extração convencional com metanol.

Reynertson et al. (2006), em seus estudos sobre compostos antioxidantes e anti-câncer presente em frutas tropicais, verificou que o extrato metanólico de jabuticaba apresentou forte atividade antioxidante no ensaio DPPH ($IC_{50} = 0,35 \text{ mg}/\mu\text{L}$) e em estudo posterior, com mesmo ensaio, apresentou IC_{50} de $0,19 \text{ mg}/\mu\text{L}$ (Reynertson et al., 2008).

4.3.1.3 Maceração da casca com nitrogênio líquido e extração com metanol

Na Tabela 8 estão representados os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do extrato metanólico, obtido do sistema convencional de cascas maceradas com nitrogênio líquido, em diferentes concentrações.

O valor máximo atingido foi de 91 % de atividade antioxidante para a concentração de 2,5 mg/mL. Demonstrando que o percentual antioxidante do extrato metanólico aumenta proporcionalmente às diferentes concentração adicionadas.

Tabela 8. Porcentagem da neutralização do DPPH do extrato metanólico de cascas maceradas com nitrogênio líquido.

Concentrações mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)
0,25	19,6
0,5	24,9
0,75	39,5
1	48,8
2,5	91,0

Após a identificação da faixa de concentração com aumento linear em relação a atividade antioxidante, uma equação da reta foi traçada e assim determinou-se o IC_{50} do extrato metanólico, da casca macerada com nitrogênio líquido, como mostrado na Figura 14.

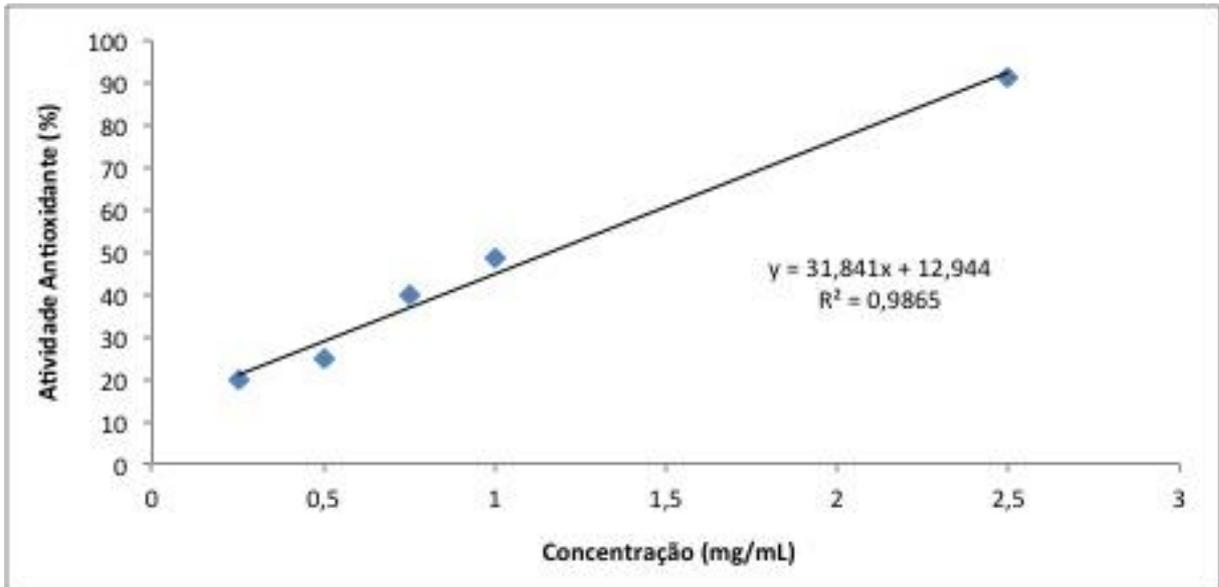


Figura 14 - Curva de Calibração da Atividade Antioxidante de extrato metanólico obtido da extração convencional com metanol de cascas *in natura* maceradas com nitrogênio líquido.

A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração utilizada ($Y = 31,841x + 12,944$) com $R^2 = 0,9865$ forneceu um IC_{50} de $0,2 \text{ mg}/\mu\text{L}$ para o extrato metanólico obtido através da extração convencional com casca macerada em nitrogênio líquido.

Comparando-se os resultados obtidos nos testes com a extração convencional, os valores de IC_{50} mantiveram-se lineares, mas, assim como nos valores da quantificação de antocianinas, a atividade antioxidante se mostrou maior para o extrato da casca de jabuticaba liofilizada e submetida à extração convencional com metanol.

4.3.2 Extratos obtidos da extração em Sistema Ultrassônico

4.3.2.1 Extrato Metanólico

Os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do extrato com metanol após extração em banho de ultrassom em diferentes concentrações estão representados na Tabela 9.

Os resultados demonstram que o percentual antioxidante do extrato com metanol aumenta proporcionalmente às diferentes concentração adicionadas, atingindo o valor máximo de 46 % de atividade antioxidante para a concentração de 1 mg/mL.

Tabela 9. Porcentagem da neutralização do DPPH do extrato metanólico obtido do banho de ultrassom.

Concentrações (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)
0,1	5,8
0,25	16,2
0,5	29,2
0,75	39,3
1	46,1

Após a identificação da faixa de concentração com aumento linear em relação a atividade antioxidante, traçou-se a equação da reta e determinou-se o IC₅₀ do extrato com metanol, como mostra a Figura 15.

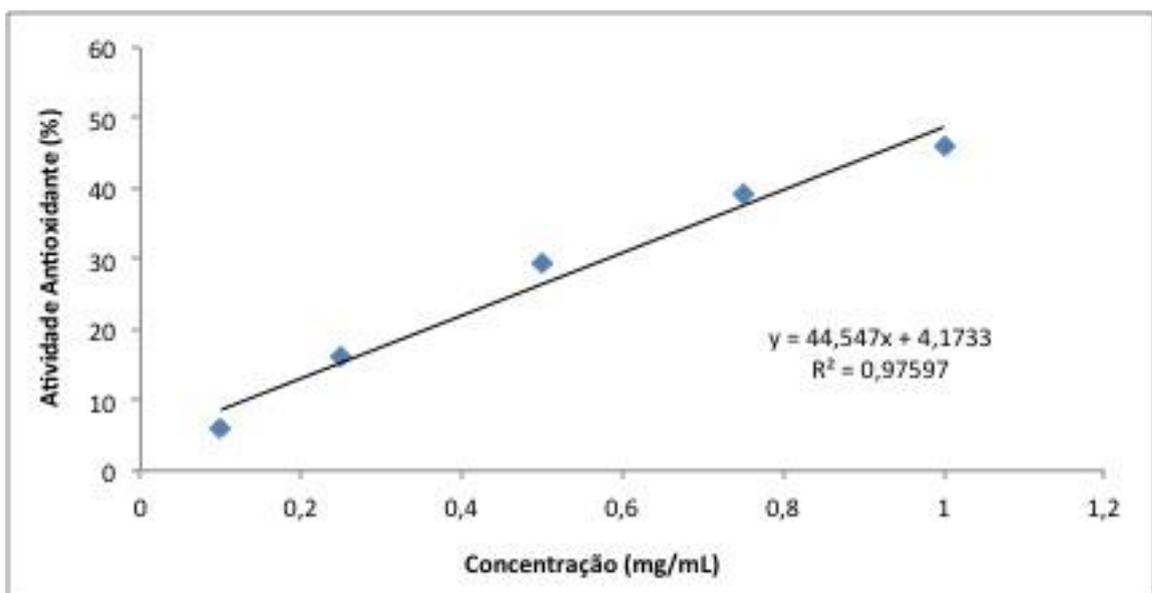


Figura 15 - Curva de Calibração da Atividade Antioxidante do Extrato Metanólico obtido da extração em Sistema Ultrassônico.

A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração utilizada ($Y = 44,547.x + 4,1733$) com $R^2 = 0,97597$ forneceu um IC_{50} de 0,1 mg/ μ L para o extrato metanólico obtido através da extração ultrassônica.

Oliveira (2010), obteve para seus extratos ultrassônicos de bagaço de uva *Syrah* desidratados valor de IC_{50} de 0,2 mg/ μ L.

4.3.2.2 Maceração da casca com nitrogênio líquido e extração com metanol

Os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do extrato metanólico, de cascas macerada com nitrogênio líquido, em diferentes concentrações estão representados na Tabela 10.

Os resultados demonstram que o percentual antioxidante do extrato com metanol aumenta proporcionalmente às diferentes concentração adicionadas, atingindo o valor máximo de 77% de atividade antioxidante para a concentração de 5 mg/mL.

Tabela 10. Porcentagem da neutralização do DPPH do extrato do banho de ultrassom de cascas maceradas com nitrogênio líquido.

Concentrações (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)
0,25	15,0
0,5	20,4
0,75	23,3
1	25,2
2,5	55,3
5	77,3

Após a identificação da faixa de concentração com aumento linear em relação a atividade antioxidante, traçou-se a equação da reta e determinou-se o IC_{50} do extrato metanólico, de cascas maceradas em nitrogênio líquido, como mostra a Figura 16.

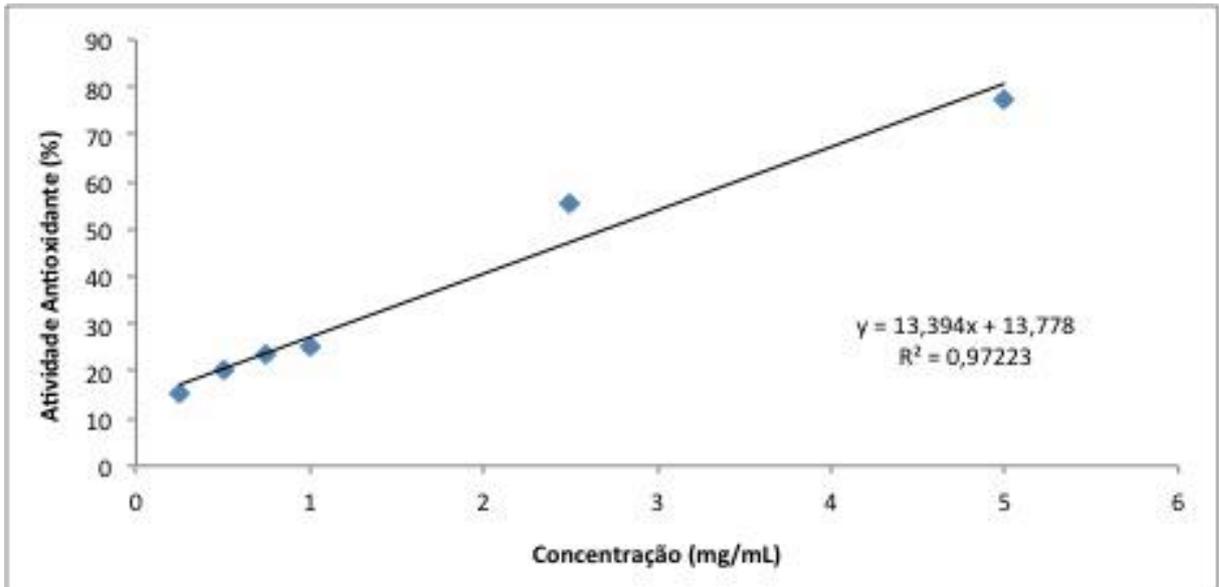


Figura 16 - Curva de Calibração da Atividade Antioxidante do extrato metanólico obtidos do sistema ultrassônico de cascas *in natura* maceradas com nitrogênio líquido.

A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração utilizada ($Y = 13,394.x + 13,778$) com $R^2 = 0,97223$ forneceu um IC_{50} de $0,3 \text{ mg}/\mu\text{L}$ para o extrato metanólico obtido através da extração ultrassônica de cascas macerada nitrogênio líquido.

Em síntese, tanto para quantificação de antocianinas totais, como para valores de atividade antioxidante (IC_{50}), a extração convencional com metanol a partir de cascas liofilizadas se mostrou mais eficiente em termos quantitativos, seguido da extração ultrassônica com extrato metanólico de cascas liofilizadas.

4.4 Cinética da extração

As Figuras 17 e 18 apresentam a curva cinética de extração das antocianinas totais em sistema convencional e ultrassônico, empregando como solvente o metanol.

Em relação ao processo extrativo em sistema convencional e com solvente metanol, a Figura 17 mostra teor máximo extraído de antocianinas totais ($435 \text{ mg}/100 \text{ g}$) e melhores resultados em um tempo de 3 horas. Já para a extração ultrassônica, também com solvente metanol, o máximo de antocianinas ($\sim 354 \text{ mg}/100 \text{ g}$) extraídas ocorre em menor tempo, apenas 1 hora (Figura 18). Isso é

atribuído ao potencial de penetração das ondas de ultrassom nas paredes celulares da amostra.

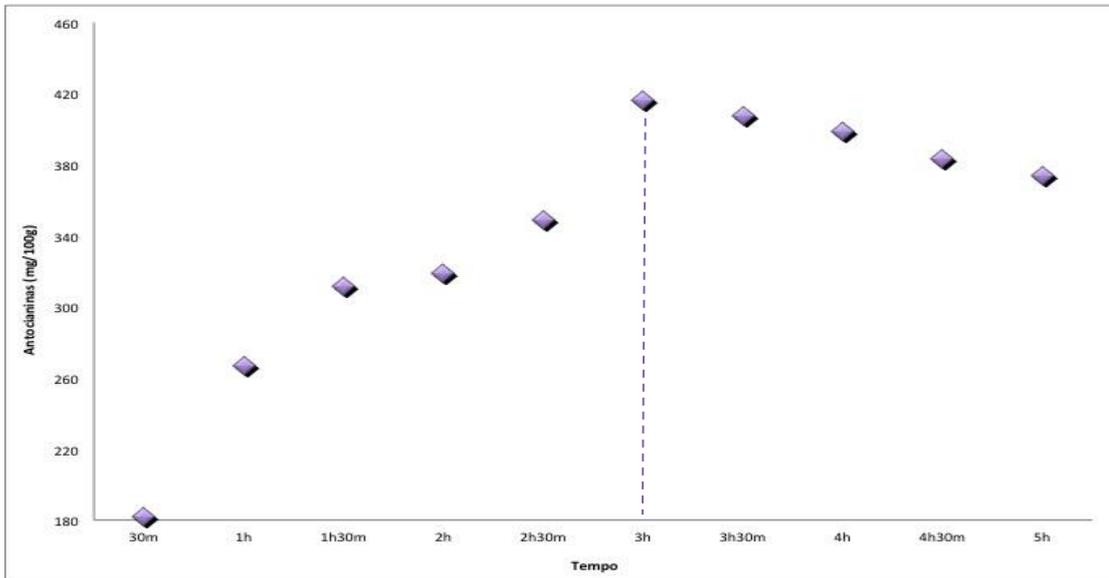


Figura 17 - Cinética de extração de antocianinas totais em sistema convencional empregando metanol.

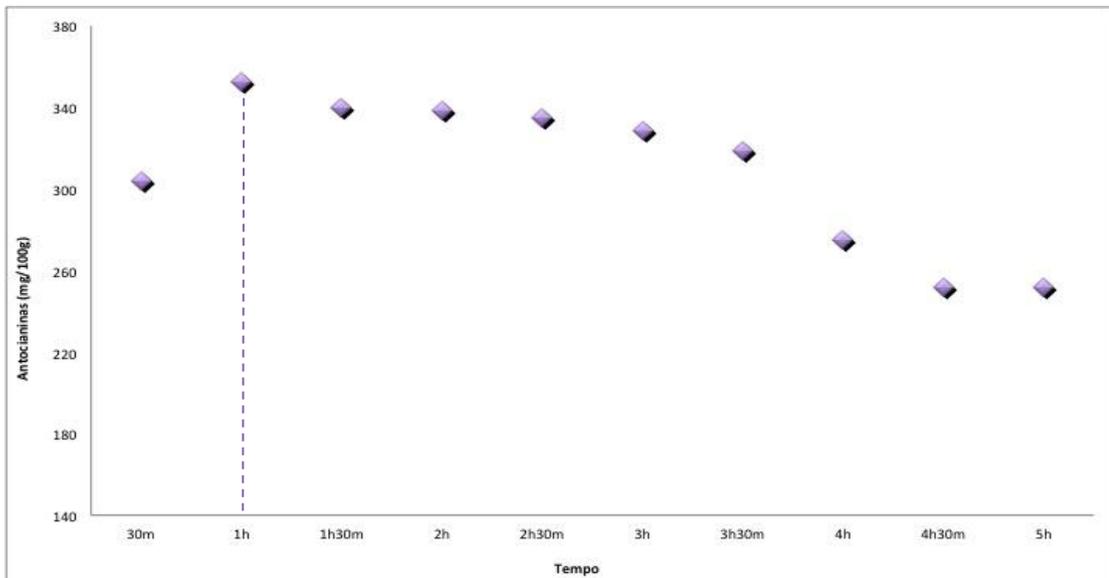


Figura 18 - Cinética de extração de antocianinas totais em sistema ultrassônico empregando metanol.

A curva de extração pode ser utilizada na determinação de parâmetros de processo, como tempo de extração, caracterização das etapas de extração e determinação da solubilidade, entre outros fatores (SILVA, 2004).

Observa-se na extração de antocianinas, que há variáveis como o tipo de solvente, a concentração, o pH, a temperatura e o tempo de extração. Estas variáveis não atuam isoladamente, e o efeito de cada uma delas deve ser avaliado em conjunto, considerando as condições de cada estudo e principalmente a fonte de antocianinas, uma vez que a facilidade de extração não é a mesma para as diferentes matrizes vegetais (SILVA, 2011).

Segundo Brunner (1994), a curva da cinética de uma extração depende dos parâmetros de processo e dos fenômenos que ocorrem durante o processo extrativo, e, devido à influência dos mais diversos fatores nesse resultado final é que seu uso para comparação de extrações de diferentes materiais e de diferentes equipamentos se torna bastante limitado, mas as informações que pode fornecer são úteis para comparar uma série de experimentos testes dentro de um mesmo estudo.

4.5 Identificação de antocianinas

Na Tabela 11 estão demonstrados os resultados (F_R) obtidos de forma experimental neste estudo, comparados com resultados da literatura (HARBORNE, 1958). A partir da cromatografia por camada delgada foi possível a identificação de três tipos de antocianinas prováveis, a delphinidina-3-glicosídeo, a cianidina-3-glicosídeo e a peonidina-3-glicosídeo, tanto no extrato metanólico obtido do sistema convencional, como no extrato ultrassônico.

Tabela 11. Antocianinas identificadas por cromatografia em camada delgada dos extratos metanólicos da casca de jabuticaba.

Fase Móvel	F_R (literatura)*	F_R (experimental)		Antocianinas Identificadas
	0,26	0,27	0,25	delfinidina-3-glicosídeo
BAA	0,38	0,36	0,38	cianidina-3-glicosídeo
	0,41	0,43	0,42	peonidina-3-glicosídeo

* HARBORNE (1958); TERCI (2004); BAA - Butanol:ácido acético:água (4:1:5, v/v/v),

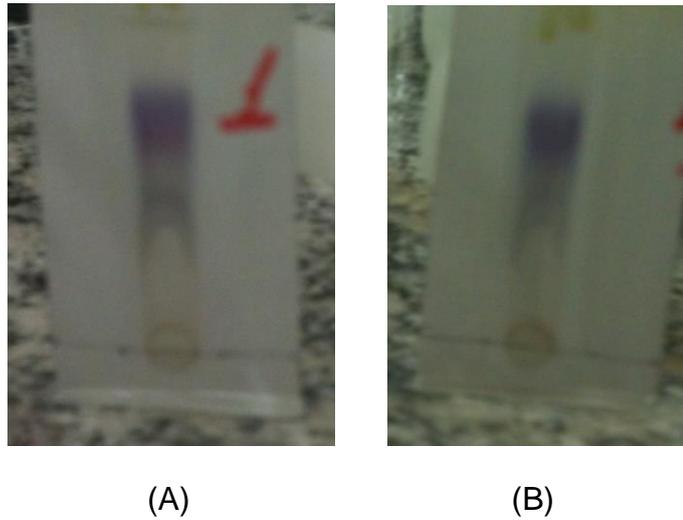


Figura 19 – Cromatografia por Camada Delgada (CCD) dos extratos antociânicos da extração convencional (A) e assistida por ultrassom (B).

Terci (2004), obteve resultados significativamente semelhantes aos deste trabalho, aplicando a cromatografia em camada delgada para extratos de jabutica e amora, foi possível separar e identificar as antocianinas devido à diferença dos valores de F_R encontrados pela autora e então comparados aos dados encontrados em literatura. Também encontrou para seus extratos de jabuticaba os mesmos três tipos de antocianinas descritos neste estudo dos extratos metanólicos (sistema convencional e ultrassônico) da casca de jabuticaba.

4 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

4.1 Conclusões

Os resultados obtidos permitiram maximizar os processos extrativos de antocianinas e definir condições operacionais dos mesmos. A seguir, detalha-se as principais conclusões obtidas no presente estudo:

- Os solventes etanol e metanol, em material vegetal liofilizado, se mostraram mais eficientes para extração de antocianinas totais.
- A máxima concentração de antocianinas (435 mg/100 g base seca) extraídas com metanol em sistema convencional foi ao utilizar 100 mL de metanol, pH=1,0, 10 g de casca liofilizada, temperatura 40 °C e 3 horas de extração. O extrato metanólico, obtidos nestas condições, também apresentou a maior atividade antioxidante - IC₅₀ (0,2 mg/ µL).
- Ao utilizar o sistema ultrassônico de extração com o metanol, o teor máximo de antocianinas totais foi de 354 mg/100 g (base seca) e atividade antioxidante (IC₅₀) de 0,3 mg/ µL, na frequência de 40 kHz, temperatura de 40 °C, 100 mL de solvente, pH = 1,0, 10 g de casca liofilizada e tempo de extração de 1 hora.
- Nos extratos foram caracterizadas com prováveis antocianinas a delphinidina-3-glicosídeo, a cianidina-3-glicosídeo e a peonidina-3-glicosídeo.

4.2 Sugestões para trabalhos futuros

Elenca-se algumas sugestões para trabalhos futuros:

- Realizar estudos de purificação e quantificação das antocianinas dos extratos por técnicas cromatográficas;
- Estudos de estabilidade das antocianinas, por técnicas de encapsulamento e secagem;
- Para fins de aplicação em alimentos, sugere-se extração com solventes de grau alimentícios (exemplo: etanol e outros);

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKEMA, S.; SEAGER, S. L. The chemical pigments of plants. **Journal of Chemical Education**. v. 59, n. 3, p. 183, 1982.
- ALVES, A. P. C. **Casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg): Processo de secagem e uso como aditivo em iogurte**. 90f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2011.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 5ª Edição. Viçosa: UFV, 601p. 2011.
- AUGUSTA, I. M. **Extração e secagem da casca de jambo vermelho (*Syzygium malaccensis*, (L.) Merryl et perry) para obtenção de corante**. 137f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2011.
- BERTOLDI, M. C. **Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica das oleoresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius Raddi*)**. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.
- BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E. Multivariate Analysis of Antioxidant Power and Polyphenolic Composition in Red Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, 2001.
- BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.F. Anthocyanins as natural food colors – selected aspects. **Food Chemistry**. v. 58, p. 103 – 109, 1997.
- BORDIGNON-LUIZ, M. T.; GAUCHE, C.; GRIS, E. F.; FALCÃO, L. D.. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems.

LWT – Food Science and Technology, v. 40, n. 4, p. 594 – 599, 2007.

BORDIGNON, C. L.; FRANCESCATTO, V.; NIENOW, A. A.; CALVETE, E.; REGINATTO, F. H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 183-188, 2009.

BORTOLATTO, J.; LORA, J.. **Avaliação da Composição Centesimal do Abacaxi (*Ananas comosus* (L.) merril) Liofilizado e *in natura***. Periódicos Unesc. 2011.

BRUNNER, G. Gas Extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process. **Darmstadt: Steinkopff**, v. 4, p. 387, 1994.

CAMPOS, D. D. P. **Extração, Purificação e Isolamento de Antocianinas de Jambolão (*Syzygium cumini*) e Avaliação dos seus Efeitos Biológicos**. 119f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from *Cabernet sauvignon* (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8413-8420, 2008.

CANUTO, G. A. B. **Caracterização, quantificação e estudo da relação retenção-propriedade anti-oxidante (QRPR) de antocianinas em extratos de morango (*Fragaria vesca*) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. 235f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Química)) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.

CHEN, F.; SUN, Y.; ZHAO, G.; LIAO, X.; HU, X.; WU, J.; WANG, Z. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 14, p. 767-778, 2007.

CIPRIANO, P. A. **Antocianinas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e casca de**

- jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) na formulação de bebidas isotônicas.** 131f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema.** 4^a ed. Artimed, 900 p. 2010.
- DOGENSKI, M. **Extração do óleo essencial e oleoresina das folhas de *Corymbia citriodora* utilizando CO₂ em condições sub e supercríticas.** 145f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de São Paulo, Pirassununga, SP, 2013.
- FAVARO, M. M. A. **Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes.** 105f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.
- FRANCIS, F. J., Food Colorants: anthocyanins, **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v.28, n.4, p.273-314, 1989.
- FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.
- FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 78-83, 1968.
- GALATO, D. **Correlação entre os dados eletroquímicos, fotométricos e de cálculos teóricos obtidos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos.** Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2004.
- GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. **Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy.** Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001.

- GOIFFON, J. P.; MOULY, P.P.; GAYDOU, E. M. Anthocyanin pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**. 382p, 39-50; 1999.
- HARBORNE, J. B. The chromatographic identification of anthocyanin pigments. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1, p. 473-488, 1958.
- HARBORNE, J. B. **Comparative biochemistry of the flavonoids**. Academic Press: London, 1967.
- HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The flavonoids**. Academic Press: New York, 1975.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods – A guide to modern techniques of plant analysis**. Chapman and Hall: New York, 3rd ed. 1998.
- JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. **Anthocyanins and betalains**. In: Natural Food Colorants, pp. 280-296. Glasgow: Blackie Academic & Professional. 1996.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, v. 73, p. 285-290, 2001.
- JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 270-273, 2005.
- KATALINIĆ, V.; MOŽINA, S. S.; SKROZA, D.; GENERALIĆ, I.; ABRAMOVIČ, H.; MILOŠ, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia. **Food Chemistry**, v. 119, p. 715-723, 2010.
- KATO, C. G.; TONHI, C. D.; CLEMENTE, E. Antocianinas de uvas (*Vitis vinifera* L.) produzidas em sistema convencional. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 06, n. 02, p. 809 – 821, 2012.

- KONG, J. M.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, p. 923-933, 2003.
- LEIDENS, N. **Extração, Purificação e Fracionamento das Antocianinas do Bagaço de Uva**. 45f. Trabalho de Conclusão em Engenharia Química - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2011.
- LIMA, A. J. B.; CORREA, A. D.; ALVES, A. P. C.; ABREU, C. M. P.; BARROS, A. M. D. Caracterização química do fruto jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.58, n.4, p.416-421, 2008.
- LIMA, A. J. B.; CORREA, A. D.; SACZK, A. A.; MARTINS, M. P.; CASTILHO, R. O. Anthocyanins, pigments stability and antioxidant activity in jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 877-887, 2011
- LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: Uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, V.13, n.3, p. 291-297, 2007.
- LEE, H. S.; HONG, V. Chromatographic analysis of anthocyanins. **Journal of Chromatography**, v. 624, p. 221-234. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1992.
- LEONG, L. P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruit in Singapore markets. **Food Chemistry**, Washington, v. 76, p. 69-75, 2002.
- LUZ, L. P. **Estudo do ultrassom como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos**. 98f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1998.
- MACHEIX, J. J., FLEURIT, A.; BILLOT, J. **Fruit Phenolics**. Boca Raton: CRC Press. 378p, 1990.

- MALIEN, A., DANGLES, O.; AMIOT, M. J.; Color stability of commercial anthocyanin based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra and intermolecular copigmentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 1, p. 170, 2001.
- MANICA, I. **Frutas nativas, silvestres e exóticas: Técnicas de produção e mercado: abiu, aroma-preta, araçá, bacuri, biribá, carambola, cereja-do-rio-grande, jabuticaba**. Porto Alegre: Cinco continentes, 372p, 2000.
- MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent Developments in the Stabilization of Anthocyanins in Food Products. **Food Chemistry**, v. 25, p. 205-225. Elsevier Applied Science Publishers Ltd, England, 1987.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade Antioxidante de Frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, 2008.
- MIRANDA, M. A. **Efeito de flavonóides na fosfoproteína tirosina fosfatase. Mecanismos cinéticos e relações estrutura atividade**. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2000.
- NARAYAN, M.S.; AKHILENDER NAIDU, K.; RAVISHANKAR, G.A. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 60, n.1, p. 1-4, 1999.
- OLIVEIRA, D. A. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades Merlot e Syrah**. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.
- PAROUL, N.; CANSIAN, R. L.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G. F.; SERAFINI, L. A.; ROTA, L.; MOYNA, P.; HEINZEN, H. Use of palmae wax hydrocarbon fractions as chemotaxonomical markers in *Butia* and *Syagrus*. **Brazilian Journal of**

Biology, v. 69, n. 2, p. 631-637, 2009.

PERES, T. B. **Noções Básicas de Cromatografia**. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção ambiental – Instituto Biológico, v. 64, n. 2, p. 227-229, São Paulo, 2002.

PIMENTEL, C. V. M. L.; FRANCKI, K. M.; BOIAGO, A. P. **Alimentos Funcionais – Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. 1ª ed., Metha, 95 p., 2005.

REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G.; Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, 4592p, 1998.

REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1228-1230, 2006.

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, p. 883-890, 2008.

RUFINO, M.S.M; ALVES, R.E; BRITO, E.S; JIMÉNEZ, J.P; CALIXTO, F.S; MANCINI- FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, vol. 121, p. 996-1002, 2010.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography**, v. 1000, p. 657-691, 2003.

ROCKENBACH, I. I. **Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinifera L.* e *Vitis labrusca L.*)**. 112f. – Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2008.

- SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of antioxidant compounds from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, p. 23-31, 2010.
- SASSO, S. A. Z. **Propagação vegetativa de jaboticabeira**. 64f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 2009.
- SCHWARTZ S. J.; VON HELBE, J.; GIUSTI, M. M. **Corantes**. In: **Química de Alimentos de Fennema**. p. 445-498, 900p., 4^a ed. Artimed, Porto Alegre: Artimed Editora. 2010.
- SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2432-2438, 2002.
- SILVA, D. C. M. N. **Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera Less*)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- SILVA, G. J. F.; CONSTANT, P. B. L.; FIGUEIREDO, R. W.; MOURA, S. M. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jaboticaba (*Myrciaria ssp.*). **Revista Alimentos e Nutrição**. v. 21, n. 3, p. 429-436, 2010.
- SILVA, P. I. **Otimização da extração e microencapsulamento de polifenóis e antocianinas de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*)**. 173f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- SILVA, M. C. **Aproveitamento do resíduo do despulpamento da jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) para obtenção de pigmento com propriedades funcionais**. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de

Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2012.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 059-064, 2008.

SONDHEIMER, E.; KERTZ, Z. I. Colorimetric determination in Strawberries and strawberry products. **Analytical Chemistry**, v. 20, p. 245, 1948.

TERCI, D. B. L. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas**. 224f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.

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

TONON, R. V. **Secagem por atomização do suco de açaí: influencia das variáveis do processo, qualidade e estabilidade do produto**. 210f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, SP, 2009

TORRES, E. M. J.; PALHARINI, M. C. A.; AFERRI, G. **Aproveitamento da jabuticaba para o processamento de licores**. Polo Regional Centro Oeste, Pesquisa e Tecnologia, APTA Regional, v. 8, n. 2, 2011.

VAN BUREN, J.P.; BERTINO, J.J.; SON, W.B., et al. Stability of wine anthocyanins on exposure to heat and light. **American Journal Enology & Viticulture**, v. 19, n. 3, p. 147, 1968.

APÊNDICE I

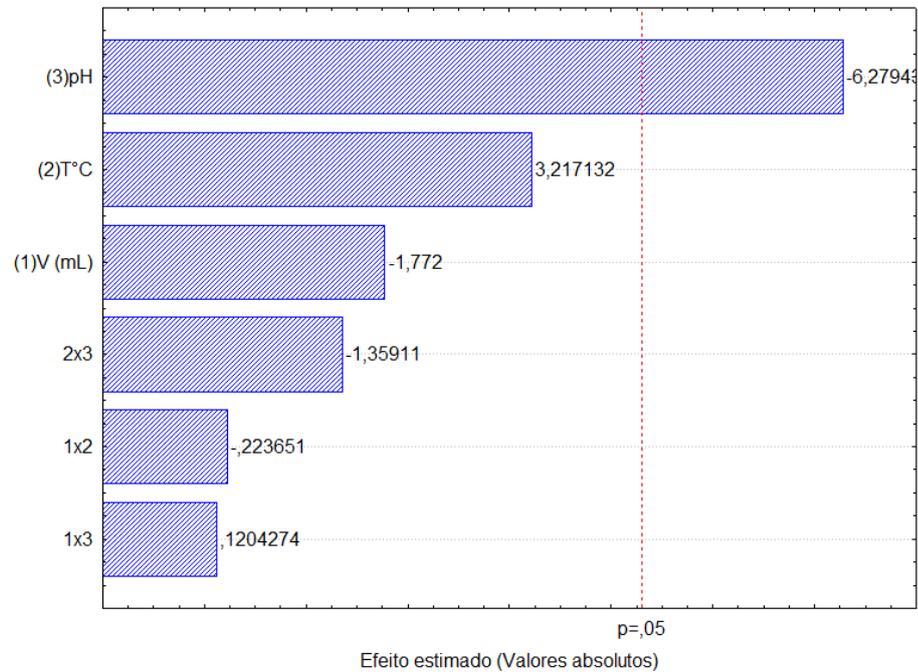


Figura: Gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2^3 da extração de antocianinas com metanol.

Tabela: Análise de Variância – ANOVA, para extração com metanol.

Fontes de Variação	Somas de Quadrado	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado
Regressão	23157,750	6	3859,63	9,12
Resíduo	1692,97	4	423,244	
Falta de Ajuste	848,31	2		
Erro Puro	844,67	2		
Total	24850,73	10		

$F_{tab\ 0,95; 6; 4} = 6,13$; Coeficiente de correlação: $R = 0,95$

