

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES**  
**URI CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE  
EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA CASCA DO ARAÇÁ-  
VERMELHO (*Psidium cattleianum* Sabine)**

**MONALISE MARCANTE MEREGALLI**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus Erechim, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**ERECHIM, RS – BRASIL**  
**JANEIRO DE 2017**

**Estudo comparativo de diferentes métodos de extração de compostos bioativos do araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine)**

Monalise Marcante Meregalli

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus Erechim, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Comissão julgadora:

---

Dra. Geciane Toniazzo Backes  
Orientadora

---

Dr. Marcelo Luis Mignoni  
Orientador

---

Dr. Wagner Luiz Priamo  
Externo – IFRS Campus Erechim

---

Dr. Rogério Luis Cansian  
URI – Erechim

Erechim, janeiro de 2017.

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.

## *DEDICATÓRIA*

*“Ao meu amor Neomar, por compreender,  
acreditar, confiar e estar ao meu lado sempre.  
Ao meu pequeno Arthur, que me faz querer ser  
uma pessoa melhor a cada dia.”*

## AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha mãe Nilva e ao meu pai Dorvalino (*in memoriam*) que, por seus exemplos, me guiam em todos os momentos! Aos meus irmãos Douglas e Gabriele por me motivarem e sempre torcerem pelo meu sucesso.

Ao meu avô Antônio, por ser o combustível da minha jornada, e aos meus tios Tere, Lucia, Beto, Bia e Paulo, que sempre estiveram me dando forças, com orações e muito carinho.

À minha sogra Leonice, meu sogro Edgar e minha cunhada Joseane, por toda a ajuda com o Arthur e encorajamento durante esses dois anos.

Aos professores Geciane T. Backes e Marcelo Mignoni, pela orientação e paciência. Aos professores Alexander Junges, Jamile Zeni e Eunice Valduga por estarem sempre disponíveis para meus questionamentos.

Aos funcionários da URI – Erechim, em especial Liane e Andreia pelo excelente trabalho, sempre com muita agilidade e simpatia.

Ao IFRS – Campus Erechim pela disponibilidade dos laboratórios e pela liberação parcial da carga horária para a realização dos estudos.

À CAPES pela concessão da bolsa-taxa, que permitiu com que eu continuasse o mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Termodinâmica da URI – Erechim, Sandi, Leticia e Naira. Amizades recentes, mas que com certeza permanecerão para toda a vida.

À Andreia, que me auxiliou com as dúvidas de todas as espécies. Sempre prestativa e disponível, com certeza uma pessoa que jamais esquecerei!

À querida Dani Bucior, que me auxiliou durante os experimentos. Você é incrível!

Aos colegas da turma PPGEAL 2015/1 pela parceria durante as disciplinas.

Ao amigo Guilherme Moura por ter iniciado comigo essa jornada, sempre disponível e me dando força para não desistir, mesmo em momentos em que essa era a maior vontade.

Aos amigos Andressa, Cristiane, Josiele, Vinicius, Catia, Julio, Celso e Airton, que vibraram com os primeiros resultados positivos, acompanharam toda a pesquisa e ainda conseguiam me oferecer o ombro quando os momentos eram difíceis. Vocês estarão sempre no meu coração!

E, por fim, o meu agradecimento especial a todos que de alguma forma estiveram contribuindo comigo nessa trajetória.

*“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar”.*

*(Anatole France)*

Resumo da Dissertação de Mestrado 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.

## **Estudo comparativo de diferentes métodos de extração de compostos bioativos do araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine)**

**Monalise Marcante Meregalli**

**Janeiro/2017**

Orientadores: Dra. Geciane Toniazzo Backes

Dr. Marcelo Luis Mignoni

O araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) é um fruto nativo do Rio Grande do Sul, mas pode ser encontrado em diversos estados do Brasil e até em países da América Central. Possui altos teores de açúcares, fibra alimentar e compostos bioativos, responsáveis pela cor do fruto e que apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória, bactericida e fungistática. O presente trabalho objetivou extrair compostos bioativos da casca do fruto araçá-vermelho através dos métodos convencional por maceração e assistido por ultrassom, comparando os resultados obtidos. Foram avaliados o comportamento das antocianinas frente ao pré-tratamento da matriz vegetal (secagem), o solvente a ser utilizado, a cinética de extração dos dois métodos, compostos fenólicos totais, flavonoides, carotenóides e atividade antioxidante. A secagem em estufa de circulação de ar promove degradação das antocianinas, mesmo a temperaturas inferiores a 40°C, inviabilizando sua utilização. A partir disto, a matriz vegetal foi apenas descongelada e triturada para a realização das análises. Após experimentos preliminares, o solvente escolhido foi o etanol 90% acidificado com 0,01% de HCl. As condições de agitação, relação massa de amostra/volume de solvente, pH e temperatura foram testadas através de dois delineamentos fatoriais (DCCR), onde concluiu-se que a agitação foi a única variável que não exerceu efeito significativo ao nível de 5%. A relação massa de amostra/volume de solvente e pH exerceram efeito negativo e a temperatura efeito positivo. As condições ideais encontradas para extração convencional foram: solvente etanol 90%, tempo de 2h, pH 1,5, temperatura de 40°C e relação massa de amostra/volume de solvente 1g/10mL. O teor máximo de antocianinas totais obtido através desta metodologia foi de 116,81 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca. A extração assistida por ultrassom foi realizada em 50KHz, utilizando as condições otimizadas obtidas na metodologia convencional. Este método não apresentou diferença significativa quanto ao teor de antocianinas totais em comparação com o método convencional. Entretanto, após o estudo da cinética de extração, verificou-se que o tempo ideal de processo é de 90 minutos, o qual acarreta um teor de antocianinas de 121,85 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca, cerca de 12% maior do que a metodologia convencional no mesmo tempo. Em tempos superiores a 90 minutos, ocorre a degradação de antocianinas na extração assistida por ultrassom nas condições estudadas. A análise dos demais compostos bioativos da casca do araçá-vermelho obteve altos teores de fenólicos totais (589,49 e 477,53 Eq. mg de ácido gálico/100g de casca), flavonoides (374,05 e 351,80 mg de catequina/100g de casca) e carotenóides (4,47 e 4,45 µg de β-caroteno/mL de extrato) para a extração assistida por

ultrassom e convencional, respectivamente. A avaliação da atividade antioxidante apresentou altos percentuais de inibição de DPPH, com valores entre 86,31 e 85,57%. A extração assistida por ultrassom apresentou maiores teores em todos os compostos bioativos analisados, porém somente para fenólicos totais e flavonoides a diferença foi significativa ao nível de 5% em comparação à metodologia convencional. Os resultados obtidos neste estudo confirmam que o araçá-vermelho, em especial a casca, é rico em compostos bioativos, sendo benéficos na prevenção de radicais livres e doenças.

**PALAVRAS-CHAVE:** cianidina-3-glicosídeo, etanol, planejamento experimental, extração assistida por ultrassom, extração por maceração.

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

## **Comparative study of different methods of extracting bioactive compounds from the red-araçá (*Psidium cattleianum* Sabine)**

**Monalise Marcante Meregalli**

**January/2017**

Mentors: Dra. Geciane Toniazzo Backes

Dr. Marcelo Luis Mignoni

The red-araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) is a native fruit of Rio Grande do Sul, but can be found in several states of Brazil and even in Central American countries. It has high levels of sugars, dietary fiber and bioactive compounds, responsible for the color of the fruit and which present antioxidant, anti-inflammatory, bactericidal and fungistatic activity. The objective of the present work was to extract bioactive compounds from the bark of the araçá-red fruit using the conventional maceration and ultrasonic assisted methods, comparing the obtained results. The behavior of the anthocyanins against the pre-treatment of the vegetal matrix (drying), the solvent to be used, the extraction kinetics of the two methods, total phenolic compounds, flavonoids, carotenoids and antioxidant activity were evaluated. Drying in an air circulation oven promotes degradation of anthocyanins, even at temperatures below 40 ° C, making it impossible to use them. From this, the plant matrix was only thawed and crushed for the analysis. After preliminary experiments, the solvent chosen was 90% ethanol acidified with 0.01% HCl. The stirring conditions, sample mass / volume ratio, pH and temperature were tested using two factorial designs (DCCR), where it was concluded that agitation was the only variable that did not have a significant effect at the 5% level. The ratio of sample mass / volume of solvent and pH had a negative effect and a positive effect temperature. The ideal conditions for conventional extraction were: solvent 90% ethanol, time 2h, pH 1.5, temperature 40 ° C and sample mass / volume ratio 1g / 10mL solvent. The maximum total anthocyanins content obtained by this methodology was 116.81 eq. Mg of cyanidin-3-glycoside / 100g of bark. Ultrasound assisted extraction was performed at 50KHz, using the optimized conditions obtained in the conventional methodology. This method showed no significant difference in total anthocyanin content compared to the conventional method. However, after the extraction kinetics study, it was verified that the ideal process time is 90 minutes, which results in an anthocyanin content of 121.85 Eq.mg of cyanidin-3-glycoside / 100g of bark, about of 12% higher than the conventional methodology at the same time. At times greater than 90 minutes, degradation of anthocyanins occurs in the extraction assisted by ultrasound in the conditions studied. The analysis of the other bioactive compounds of the red-apple bark obtained high total phenolic contents (589,49 and 477,53 Eq.mg gallic acid / 100g bark), flavonoids (374.05 and 351.80 mg catechin / 100g of bark) and carotenoids (4.47 and 4.45 µg of β-carotene / mL extract) for both ultrasonic and conventional assisted extraction, respectively. The evaluation of the antioxidant activity presented high percentages of DPPH inhibition, with values between 86.31 and 85.57%. Ultrasonic assisted extraction showed higher levels in all bioactive compounds analyzed, but only for total phenolics and

flavonoids, the difference was significant at the 5% level compared to the conventional methodology. The results obtained in this study confirm that the red araca, especially the bark, is rich in bioactive compounds, being beneficial in the prevention of free radicals and diseases.

**KEYWORDS:** cyanidin-3-glycoside, ethanol, experimental design, ultrasonic assisted extraction, conventional extraction.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>16</b> |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>   | <b>18</b> |
| 2.1 Objetivo geral .....   | 18        |
| 2.2 Objetivos específicos .....                                    | 18        |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                               | <b>19</b> |
| 3.1 Frutos nativos do Rio Grande do Sul .....                      | 19        |
| 3.1.1 <i>Araçá-vermelho (Psidium cattleianum Sabine)</i> .....     | 19        |
| 3.2 Radicais livres e antioxidantes .....                          | 21        |
| 3.3 Compostos bioativos .....                                      | 23        |
| 3.3.1 <i>Compostos fenólicos (polifenóis)</i> .....                | 24        |
| 3.3.2 <i>Flavonoides</i> .....                                     | 25        |
| 3.3.3 <i>Antocianinas</i> .....                                    | 26        |
| 3.3.3.1 <i>Estabilidade das antocianinas</i> .....                 | 30        |
| 3.3.3.2 <i>Fatores que afetam a extração de antocianinas</i> ..... | 30        |
| 3.3.4 <i>Carotenóides</i> .....                                    | 31        |
| 3.4 Métodos de extração de compostos bioativos .....               | 33        |
| 3.4.1 <i>Extração convencional por maceração</i> .....             | 33        |
| 3.4.2 <i>Extração assistida por ultrassom (US)</i> .....           | 33        |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                  | <b>35</b> |
| 4.1 Colheita e armazenamento dos frutos .....                      | 36        |
| 4.2 Caracterização físico-química da casca .....                   | 37        |
| 4.2.1 <i>Umidade</i> .....   | 37        |
| 4.2.2 <i>Lipídios</i> .....  | 37        |
| 4.2.3 <i>Proteínas</i> .....                                       | 37        |
| 4.2.4 <i>Resíduo mineral fixo (RMF)</i> .....                      | 37        |
| 4.2.5 <i>Carboidratos totais (CT)</i> .....                        | 38        |
| 4.2.6 <i>pH</i> .....  | 38        |
| 4.2.7 <i>Sólidos solúveis</i> .....                                | 38        |
| 4.3 Testes preliminares .....                                      | 38        |
| 4.3.1 <i>Efeito do processamento térmico</i> .....                 | 38        |
| 4.3.2 <i>Extração e quantificação de antocianinas totais</i> ..... | 39        |
| 4.3.3 <i>Influência do tipo e concentração de solvente</i> .....   | 40        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.3.4 <i>Cinética do tempo de extração via método convencional</i> .....                                 | 40        |
| 4.4 Delineamento experimental.....   | 41        |
| 4.4.1 <i>Efeito da agitação e relação massa de amostra/volume de solvente</i> .....                      | 41        |
| 4.4.2 <i>Efeito do pH e temperatura</i> .....  | 41        |
| 4.5 Extração assistida por ultrassom.....  | 42        |
| 4.6 Determinação de compostos bioativos .....  | 43        |
| 4.6.1 <i>Determinação de compostos fenólicos totais</i> .....  | 43        |
| 4.6.2 <i>Determinação de flavonoides</i> .....   | 44        |
| 4.6.3 <i>Determinação de carotenóides</i> .....  | 44        |
| 4.6.4 <i>Avaliação da atividade antioxidante</i> .....   | 45        |
| 4.7 Análises Estatísticas .....  | 45        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>46</b> |
| 5.1 Caracterização físico-química da casca.....  | 46        |
| 5.2 Efeito do processamento térmico no teor de antocianinas totais (AT).....                             | 47        |
| 5.3 Influência do solvente.....  | 49        |
| 5.3.1 <i>Tipo de solvente</i> .....  | 49        |
| 5.3.2 <i>Concentração de solvente</i> .....  | 50        |
| 5.4 Cinética da extração pelo método convencional .....  | 50        |
| 5.5. Delineamento experimental.....  | 51        |
| 5.5.1 <i>Efeito da agitação e da relação massa de amostra/volume de solvente</i> .....                   | 51        |
| 5.5.2 <i>Efeito do pH e temperatura</i> .....  | 53        |
| 5.6 Extração assistida por ultrassom.....  | 56        |
| 5.6.1 <i>Cinética da extração assistida por ultrassom</i> .....  | 56        |
| 5.7 Comparação dos resultados obtidos a partir das extrações convencional e assistida por ultrassom..... | 57        |
| 5.7.1 <i>Tempo de extração</i> .....   | 57        |
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>64</b> |
| <b>APÊNDICE .....</b>  | <b>74</b> |
| A – FIGURAS .....  | 74        |
| B – TABELAS .....  | 76        |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Araçá-vermelho ( <i>Psidium cattleianum</i> Sabine) em diferentes fases de maturação.   | 20 |
| Figura 2 – Estresse oxidativo e seus possíveis impactos na saúde humana.   | 22 |
| Figura 3 – Subdivisão dos compostos bioativos presentes nos vegetais.  | 23 |
| Figura 4 – Estrutura química dos flavonoides.  | 25 |
| Figura 5 – Estrutura química das principais classes de flavonoides.  | 25 |
| Figura 6 – Estrutura química das antocianinas (cátion flavílio).   | 27 |
| Figura 7 – Possíveis mudanças estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH do meio em que se encontram.   | 29 |
| Figura 8 – Mudanças na coloração das soluções aquosas de antocianinas em diferentes valores de pH.   | 29 |
| Figura 9 – Estruturas químicas dos principais carotenóides (carotenos e xantofilas).   | 32 |
| Figura 10 – Processo de cavitação promovida pela extração assistida por ultrassom (US).  | 34 |
| Figura 11 – Fluxograma apresentando as etapas desenvolvidas na pesquisa.   | 35 |
| Figura 12 – Araçá-vermelho ( <i>Psidium cattleianum</i> Sabine) no ponto de colheita.  | 36 |
| Figura 13 – Cinética da secagem da casca de araçá-vermelho ( <i>Psidium cattleianum</i> Sabine), realizada em estufa de circulação à temperatura de $38 \pm 1$ °C.   | 48 |
| Figura 14 – Teor de antocianinas totais (AT) extraídas do araçá-vermelho em função de diferentes concentrações do solvente etanol.   | 50 |
| Figura 15 – Cinética da extração de antocianinas totais através do método convencional.  | 51 |
| Figura 16 – Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis agitação e relação massa de amostra/volume de solvente testadas no planejamento fatorial completo $2^2$ para a extração de AT* da casca do araçá-vermelho. | 53 |
| Figura 17 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) em função do pH e da temperatura para a extração de antocianinas totais da casca do araçá-vermelho.   | 55 |
| Figura 18 – Cinética da extração de AT de casca de araçá-vermelho através da metodologia assistida por ultrassom (US).   | 57 |
| Figura 19 – Comparação das cinéticas de extração através das metodologias convencional e assistida por ultrassom.  | 58 |

**LISTA DE TABELAS**

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Composição físico-química do araçá-vermelho ( <i>Psidium cattleianum</i> Sabine).....  | 21 |
| Tabela 2 – Classes de compostos fenólicos em plantas.....   | 24 |
| Tabela 3 – Antocianinas mais frequentes em alimentos e suas fontes. ....  | 27 |
| Tabela 4 – Grupos substituintes de hidroxilas do cátion flavílio encontradas na natureza e importantes em alimentos. ....   | 28 |
| Tabela 5 – Variáveis independentes e níveis (valores reais e codificados) utilizados no delineamento composto central rotacional para o teor de antocianinas totais da casca do araçá-vermelho. ....                        | 41 |
| Tabela 6 – Variáveis independentes e níveis (valores reais e codificados) utilizados no DCCR para o teor de antocianinas totais da casca do araçá-vermelho. ....  | 42 |
| Tabela 7 – Valores médios e desvio padrão das análises físico-químicas da casca do araçá-vermelho. ....   | 46 |
| Tabela 8 – Teor de antocianinas totais da casca do araçá-vermelho sob diferentes processamentos (descongelamento e secagem). ....   | 48 |
| Tabela 9 – Teor de antocianinas totais extraídos sob diferentes solventes orgânicos. ....   | 49 |
| Tabela 10 – Matriz do planejamento fatorial completo 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) das variáveis agitação e relação massa de amostra/volume de solvente e respostas do teor de antocianinas totais (AT)..... | 52 |
| Tabela 11 – Matriz do planejamento fatorial completo 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) das variáveis pH e temperatura e respostas em teor de antocianinas totais dos ensaios em extração com etanol 90%. ....    | 54 |
| Tabela 12 – Comparativo do teor de antocianinas totais entre o método convencional de extração por maceração e assistida por ultrassom. ....  | 59 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| °BRIX                           | Escala numérica de índice de refração de uma solução |
| AA                              | Atividade antioxidante                               |
| AlCl <sub>3</sub>               | Cloreto de alumínio                                  |
| ANOVA                           | Análise de variância                                 |
| C                               | Carbono  |
| CT                              | Carboidratos totais                                  |
| DCCR                            | Delineamento composto central rotacional             |
| DPPH                            | 1,1-difenil-2-picrilhidrazila                        |
| E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub>  | Coefficiente de extinção molar específico            |
| F <sub>calc</sub>               | Valor de F calculado                                 |
| F <sub>tab</sub>                | Valor de F tabelado                                  |
| H                               | Hidrogênio   |
| HCl                             | Ácido clorídrico                                     |
| KHz                             | Hertz  |
| IC <sub>50</sub>                | Concentração necessária para reduzir em 50% o DPPH   |
| LiCl                            | Cloreto de lítio                                     |
| NaClO                           | Hipoclorito de sódio                                 |
| NaCO <sub>3</sub>               | Carbonato de sódio                                   |
| NaNO <sub>2</sub>               | Nitrito de sódio                                     |
| NaOH                            | Hidróxido de sódio                                   |
| P.A.                            | Grau de pureza do reagente                           |
| pH                              | Potencial hidrogeniônico                             |
| Ppm                             | partes por milhão                                    |
| R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> | Radicais substituintes nas antocianinas              |
| RMF                             | Resíduo mineral fixo                                 |
| ROS                             | Radicais livres                                      |
| Rpm                             | rotações por minuto                                  |
| US                              | Ultrassom  |
| UV                              | Ultravioleta   |
| X <sub>1</sub> e X <sub>2</sub> | Variáveis independentes do DCCR                      |
| X <sub>E</sub>                  | Umidade de equilíbrio                                |

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, observa-se que os consumidores estão em busca de alimentos que possuam compostos benéficos à saúde, também chamados de bioativos ou fitoquímicos (REISSIG, 2015). Uma dieta alimentar rica em produtos de origem vegetal auxilia na diminuição do risco de doenças crônicas não-transmissíveis, como diabetes, hipertensão, arterosclerose e alguns tipos de câncer (BASTOS et al., 2009), justamente pela presença dos compostos bioativos, pois estes atuam principalmente na diminuição do dano oxidativo às células que provém da formação de radicais livres.

O Brasil tem uma grande diversidade biológica, ocupando o terceiro lugar mundial na produção de frutos, com 40 milhões de ton/ano (IBRAF, 2011). Esta diversidade aliada à grande produtividade pode ser explorada sustentavelmente para produzir extratos com aplicação terapêutica no controle e prevenção de doenças crônicas. Entre a flora nativa brasileira, a Família *Myrtaceae* destaca-se por apresentar espécies que produzem frutos pequenos, consumidos apenas pelas populações locais e alguns animais silvestres, e encontradas desde o Amazonas até a região Sul do país (SANTOS et al., 2007). O araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) é um fruto pertencente à esta família.

Fruto nativo do Rio Grande do Sul, o araçá-vermelho possui o formato globoso, polpa succulenta levemente ácida e numerosa quantidade de sementes. É rico em compostos bioativos, possuindo alto teor de compostos fenólicos, vitamina C e ácidos graxos insaturados. Embora apresentem potencial como fonte nutricional e como matéria-prima para agroindústria de alimentos, dados sobre o cultivo, produção e utilização dessa espécie frutífera na alimentação humana são escassos.

Os compostos bioativos ou fitoquímicos são substâncias derivadas do metabolismo secundário dos vegetais e que trazem benefícios à nossa saúde, como já mencionado anteriormente. Dentre estes compostos, as antocianinas merecem um enfoque especial por configurarem como pigmentantes naturais, que podem ser utilizados no processamento de alimentos, além de ser potencialmente benéficas à saúde na prevenção de doenças.

A extração é um dos processos mais utilizados para obtenção de compostos bioativos, onde um solvente age na estrutura celular do vegetal, retirando o composto de interesse. Entre os métodos mais comuns de extração, estão a maceração e percolação (extração convencional) e as metodologias consideradas como não-convencionais, como a assistida por ultrassom (US), líquido pressurizado (PLE) e fluido supercrítico (SFE).

Enquanto as extrações convencionais dispõem um maior volume de solvente e tempo para a obtenção de resultados, as metodologias não-convencionais vem se mostrando mais eficazes, reduzindo estes parâmetros. Entretanto, os custos destes processos ainda são altos, o que pode em muitos casos tornar o custo-benefício inviável.

Na gama da pesquisa, a avaliação das variáveis de um processo pode ser realizada através de várias formas, mas a ferramenta do planejamento experimental fatorial apresenta-se vantajosa pelo seu menor número de ensaios em comparação à outros métodos, como a avaliação de uma variável por vez por exemplo, mas mesmo assim explorando todo o espaço experimental. Por isto, deve ser levada em consideração no programa experimental a ser realizado.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a casca do araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) quanto à sua composição físico-química e extrair compostos bioativos através dos métodos convencional (maceração) e assistido por ultrassom (US). O enfoque principal foi a otimização da extração das antocianinas totais a partir do planejamento experimental fatorial, mas os demais compostos bioativos como fenólicos, flavonoides e carotenoides, e a atividade antioxidante dos extratos também foram avaliados. Os resultados obtidos pelos dois métodos de extração foram comparados visando obter o melhor processo para a extração das antocianinas totais da casca do araçá-vermelho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Extrair compostos bioativos da casca do fruto araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) pelos métodos convencional (maceração) e assistido por ultrassom.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a composição físico-química da casca do araçá-vermelho;
- Avaliar o comportamento das antocianinas frente à secagem da casca do araçá-vermelho;
- Avaliar a influência do tipo e concentração do solvente na extração de antocianinas totais da casca do araçá-vermelho;
- Realizar a cinética de extração do método convencional;
- Empregar a técnica de planejamento experimental para otimizar a extração de antocianinas da casca do araçá-vermelho com o método convencional;
- Extrair antocianinas totais da casca do araçá-vermelho empregando o método assistido por ultrassom;
- Realizar a cinética da extração assistida por ultrassom;
- Quantificar compostos fenólicos totais, flavonoides, carotenóides e atividade antioxidante dos extratos obtidos pelas duas metodologias de extração.
- Comparar os resultados obtidos nos dois métodos de extração.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item será abordada a fundamentação teórica necessária para o desenvolvimento deste trabalho, apresentando tópicos sobre os frutos nativos do Rio Grande do Sul, o araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine), os compostos bioativos e métodos de extração.

#### 3.1 Frutos nativos do Rio Grande do Sul

O Rio Grande do Sul possui uma grande biodiversidade vegetal, cujo número estimado de espécies é de 55 mil, sendo pelo menos 5 mil destas, nativas (BRACK et al., 2007). Como exemplo disto tem-se a família *Myrtaceae*, que possui grande abrangência no estado com, pelo menos, 133 gêneros e cerca de 3800 espécies (ANDRADE et al., 2008). A região Sul do Brasil é uma das três áreas do mundo que apresenta maior diversidade de plantas desse gênero, demonstrando o quanto desenvolver pesquisas com frutos nativos pode agregar economicamente e socialmente à essa região do país (VANIN, 2015).

Muitos frutos nativos do Rio Grande do Sul, mesmo que conhecidos, não são explorados economicamente, e o seu consumo basicamente se restringe aos frutos *in natura* ou quando estes são utilizados em geleias artesanais (GOEDERT, 2007). Entretanto, estão despertando o interesse dos pesquisadores, visto que muitos são ricos em antioxidantes e demais substâncias bioativas que podem trazer benefícios a saúde.

Entre os estudos que estão sendo realizados, destaca-se Faria et al. (2008), que extraíram vitamina C, provitamina A e compostos fenólicos em valores expressivos na polpa de butiá, e também Jacques et al. (2010) que verificaram a presença de composto fenólicos em quantidades próximas a 2 g/100 g de fruto na amora-preta.

##### 3.1.1 Araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine)

O araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) é uma espécie vegetal pertencente à família *Myrtaceae*. É considerado um fruto nativo do sul do Brasil, mas que ocorre desde o Rio Grande do Sul até a Bahia, podendo ser encontrado também em alguns países da América Latina (FRANZON et al., 2009) e até mesmo na Jamaica (McCOOK-RUSSELL et al., 2012).

O nome “araçá” origina-se do tupi *ara'sa* ou do guarani *ara* (que significa céu) e *aza* (olho), ou seja, fruto com olhos (SILVA JÚNIOR, 2005). Recebe também o nome de araçá, araçá do mato, araçá do campo (MATTOS, 1978) e caracteriza-se por ser um fruto

climatérico, em formato globoso, de 1,5 a 5 cm de diâmetro (RASEIRA e RASEIRA, 1996), rico em pectina (PATEL, 2012), com polpa succulenta levemente ácida e várias sementes, que variam de 16 a 100 unidades por fruto (SANCHOTENE, 1989). A Figura 1 apresenta o fruto araçá-vermelho em diferentes fases de maturação.

Figura 1 – Araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) em diferentes fases de maturação.



Fonte: Raseira e Raseira (2000).

O araçazeiro, árvore que produz o araçá, é um arbusto que floresce entre os meses de outubro e novembro. Com altura que varia de 3 a 6 m, frutifica em pouco tempo após o plantio, com produção média de 14 kg na idade adulta, sendo o seu período de maturação no Rio Grande do Sul de dezembro a março (MANICA, 2000). No Havaí, é considerada uma planta daninha justamente pela sua rápida disseminação (McCOOK-RUSSELL et al., 2012). Dentre as várias utilizações do araçazeiro, pode-se destacar o aproveitamento dos frutos para consumo, do caule e galhos como madeira, e das suas folhas na medicina popular (FRANZON et al., 2009).

O fruto é altamente perecível, com durabilidade de 2 dias à temperatura de cerca de 25 °C. Pela sua maturação ocorrer no verão, o processamento deve ser imediato caso não for aplicado algum tratamento para prolongamento de sua vida de prateleira (DREHMER e AMARANTE, 2008).

O araçá-vermelho apresenta potencial para exploração comercial por parte de pequenos produtores rurais (WILLE et al., 2004), principalmente pelas suas características como sabor exótico (ácido-adocicado) e propriedades nutricionais, dentre as quais se destaca o elevado teor de vitamina C, que pode ser até 7 vezes superior ao encontrado em frutas cítricas (FRANZON et al., 2009). Possui ainda quantidades significativas de compostos fenólicos, sendo epicatequina e ácido gálico seus componentes principais (CORRÊA, 2009),

ácidos graxos insaturados (DALLA NORA et al., 2014) e carotenóides (FETTER et al., 2010), e também importante potencial antimicrobiano e atividade antioxidante (MEDINA et al., 2011).

Estudos recentes demonstraram que o extrato de araçá reduz a metástase de células cancerígenas do pulmão (IM et al., 2012), de cólon e mama (MEDINA et al., 2011). Na medicina popular, é utilizado como antidiarreico, antidiabético, analgésico e para tratamento contra a dor de dente (VENDRUSCOLO e MENTS, 2006). Os dados da composição físico-química e os principais compostos bioativos encontrados no fruto são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição físico-química do araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine).

| <b>Composição Físico-Química (%)</b>          |       | <b>Autor</b>                |
|---|-------|-----------------------------|
| Umidade                                       | 82,36 | Silva et al. (2008)         |
| pH  | 3,29  | Santos et al. (2007)        |
| Sólidos solúveis (°Brix)                      | 6,03  | Dalla Nora (2012)           |
| Proteínas                                     | 2,1   | McCook-Russel et al. (2012) |
| Resíduo mineral fixo                          | 5,5   | Dalla Nora et al. (2014)    |
| Carboidratos totais                           | 26,8  | Dalla Nora et al. (2014)    |
| Extrato etéreo*                               | 0,24  | Santos et al. (2007)        |
| <b>Compostos Bioativos (mg/100g de fruto)</b> |       | <b>Autor</b>                |
| Antocianinas                                  | 68,6  | Dalla Nora et al. (2014)    |
| Atividade antioxidante**                      | 48,05 | Alvarenga et al. (2016)     |
| Carotenóides                                  | 6,27  | Denardin et al. (2015)      |
| Fenólicos totais***                           | 444   | McCook-Russel et al. (2012) |
| Flavonoides***                                | 100   | Dalla Nora et al. (2014)    |

\* Composição do extrato etéreo: ácido linoleico (77,9%), ácido oleico (10,1%), ácido palmítico (7,6%), demais ácidos graxos insaturados (4,4%).

\*\* Atividade antioxidante em % de inibição DPPH.

\*\*\*Fenólicos totais e flavonoides em mg de ácido gálico e em mg de catequina/100g de fruto, respectivamente.

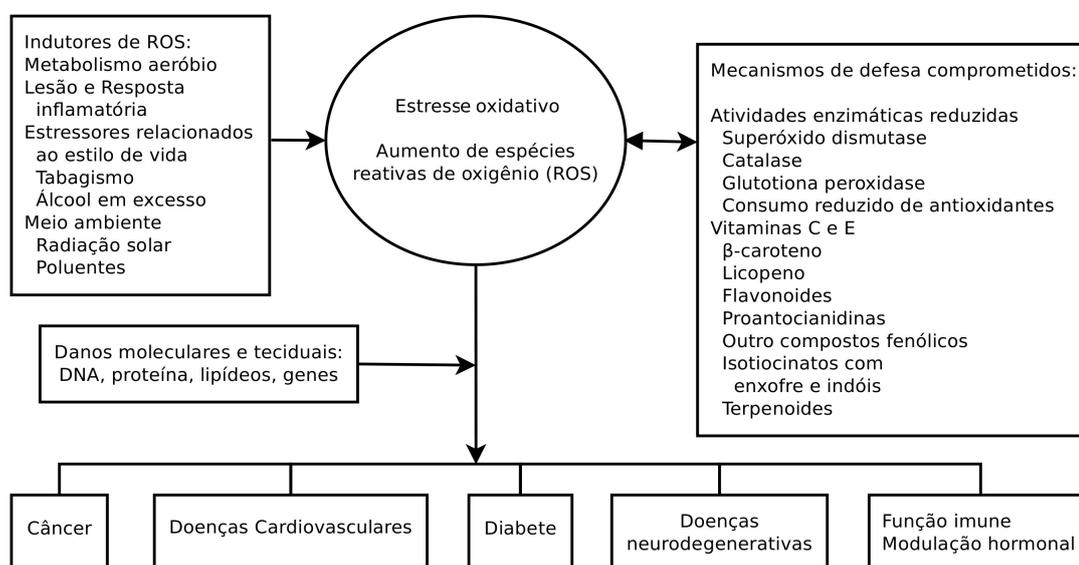
### 3.2 Radicais livres e antioxidantes

Os radicais livres são assim denominados por possuírem um ou mais elétrons não-pareados em sua estrutura, tornando-se altamente instáveis e quimicamente muito reativos

(BIANCHI e ANTUNES, 1999). São formados através da perda ou ganho de um elétron a partir de uma espécie não-radical através da cisão homolítica da ligação covalente ( $R - H \rightarrow R^* + H^*$ ), sendo importantes para o metabolismo humano, atuando como mediadores na transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, como na destruição de patógenos, no controle do crescimento celular, na desintoxicação de substâncias naturalmente presentes nos alimentos, entre outros (ARAÚJO, 2015 e ANGERAMI et al., 2012).

A formação de radicais livres ocorre de forma equilibrada com os antioxidantes no metabolismo humano. Entretanto, quando o organismo é exposto a agentes oxidantes, tais como radiações (em especial UV e gama), ozônio, medicamentos, estresse, poluição, (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2016), consumo de cigarros, inflamações ou possui uma dieta pobre em nutrientes (BIANCHI e ANTUNES, 1999), ocorre a produção excessiva de radicais livres, originando-se assim o estresse oxidativo. Esse, por sua vez, causa danos à nível celular, resultando em doenças. A Figura 2 apresenta os mecanismos indutores de radicais livres (ROS) e os possíveis impactos do estresse oxidativo na saúde humana.

Figura 2 – Estresse oxidativo e seus possíveis impactos na saúde humana.



Fonte: Damodaran et al. (2010).

As principais doenças relacionadas com a presença excessiva de radicais livres no organismo são artrite, arterosclerose, diabetes, catarata, envelhecimento precoce, câncer, disfunções cerebrais e cardíacas (BIANCHI e ANTUNES, 1999), asma, mal de Alzheimer, doenças neurodegenerativas, dentre outras (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2016).

Os antioxidantes são compostos capazes de neutralizar os radicais livres, doando a estes um elétron da sua molécula, impedindo assim a reação oxidativa sobre lipídios, aminoácidos, moléculas insaturadas e bases de DNA (BARBOSA et al., 2010). Podem ter origem enzimática dentro das células sanguíneas, como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, ou não-enzimática, frente à ingestão de alimentos ricos em vitaminas A, C e E, minerais como zinco, selênio, cobre, manganês (ANGERAMI et al., 2012), e compostos bioativos (DALLA NORA, 2012).

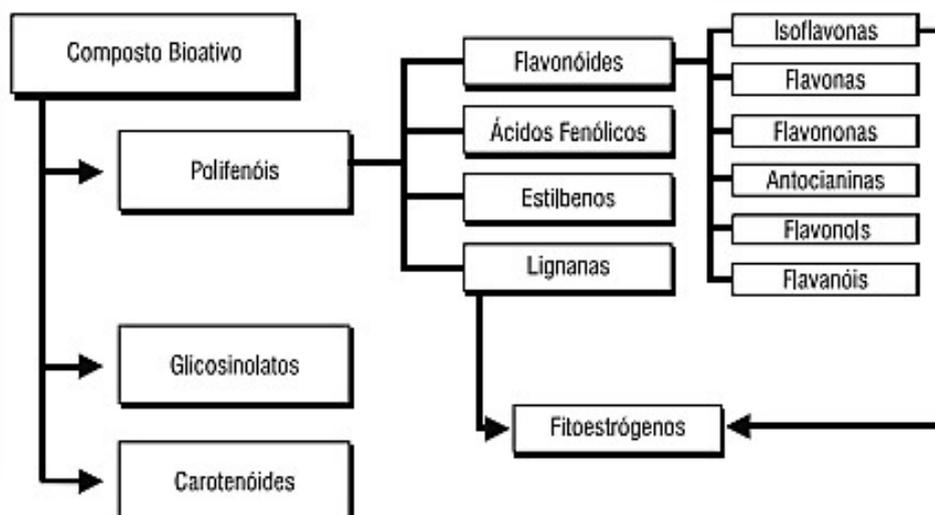
### 3.3 Compostos bioativos

Os vegetais produzem dois tipos de metabólitos: os primários, responsáveis pela sua sobrevivência – fotossíntese, assimilação de nutrientes – e os secundários, cuja atividade relaciona-se à proteção da planta. Na gama de metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, incluem-se os compostos bioativos (SILVA et al., 2010).

Os compostos bioativos, também chamados de fitoquímicos, são estruturas orgânicas obtidas de fonte vegetal, geralmente de baixo peso molecular, que exercem atividades benéficas ao organismo humano, como redução do risco de doenças coronarianas, atividade antioxidante, estimulação do sistema imunológico, redução da pressão sanguínea, regulação hormonal, entre outras (CARRATU, 2005).

Os principais elementos com propriedades bioativas nos vegetais são os compostos fenólicos ou polifenóis (que abrangem o maior grupo de substâncias), os carotenóides e os glicosinolatos. A Figura 3 exibe a subdivisão entre os bioativos presentes nos vegetais.

Figura 3 – Subdivisão dos compostos bioativos presentes nos vegetais.



Fonte: Horst (2007).

### 3.3.1 Compostos fenólicos (polifenóis)

Os compostos fenólicos, também chamados polifenóis, são estruturas químicas amplamente encontradas na natureza (SILVA et al., 2010), formadas por um anel aromático com uma ou mais hidroxilas, incluindo os seus grupos funcionais (ANGELO e JORGE, 2007). São encontrados em frutas, sementes, flores e em alguns alimentos industrializados como componente de um ingrediente que tenha sido adicionado (BRAVO, 1998).

Os compostos fenólicos são importantes para os vegetais, pois são essenciais para o seu crescimento, proteção e reprodução, atuando também no controle de patógenos, favorecendo assim o desenvolvimento da planta (ANGELO e JORGE, 2007). Atuam preventivamente em alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e neurológicas (FALLER e FIALHO, 2009), possuindo também potencial como agente antibiótico, anti-alergênico, anti-inflamatório e de proteção fotoquímica (MANACH et al., 2004).

Dentre os compostos fenólicos mais encontrados nos vegetais estão os flavonoides (que englobam as antocianinas e flavonóis), os ácidos fenólicos, os estilbenos (como o resveratrol) e as lignanas (FRANCIS, 2000). O teor de fenólicos de cada vegetal difere de conforme a sua maturidade, tipo de tecido e condições de crescimento e armazenamento (DAMODARAN et al., 2010). A Tabela 2 exhibe as classes dos compostos fenólicos.

Tabela 2 – Classes de compostos fenólicos em plantas.

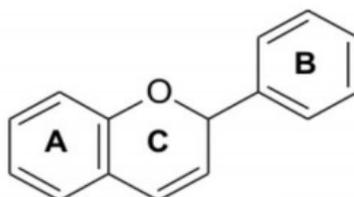
| <b>Classe</b>                       | <b>Estrutura</b>  |
|-------------------------------------|-------------------|
| Fenólicos simples, benzoquinonas    | $C_6$             |
| Ácidos hidroxibenzóicos             | $C_6-C_1$         |
| Acetofenol, ácidos fenilpropanóides | $C_6-C_2$         |
| Nafitoquinonas                      | $C_6-C_3$         |
| Xantonas                            | $C_6-C_4$         |
| Estilbenos, antoquinonas            | $C_6-C_1-C_6$     |
| Flavonoides, isoflavonoides         | $C_6-C_2-C_6$     |
| Lignanas, neolignanas               | $(C_6-C_3)_2$     |
| Biflavonoides                       | $(C_6-C_3-C_6)_2$ |
| Ligninas                            | $(C_6-C_3)_n$     |
| Taninos condensados                 | $(C_6-C_3-C_6)_n$ |

Fonte: Angelo e Jorge (2007).

### 3.3.2 Flavonoides

Os flavonoides são o maior grupo entre os compostos bioativos conhecidos, com mais de 5000 compostos já identificados (FALLER e FIALHO, 2009), sendo encontrados em hortaliças, frutas, cereais, chás, café, cacau, vinho, suco de frutas e soja (HORST e LAJOLO, 2004). Constituídos por 15 átomos de carbono ( $C_6-C_3-C_6$ ) na conformação de dois anéis aromáticos (A e B), unidos via carbono heterocíclico (C) que pode ser um pirano – flavanóis (catequinas) e antocianidinas – ou pirona, como nos flavonóis, flavonas, isoflavonas e flavanonas (LIU, 2004; SILVA et al., 2010). A Figura 4 apresenta a estrutura química dos flavonoides.

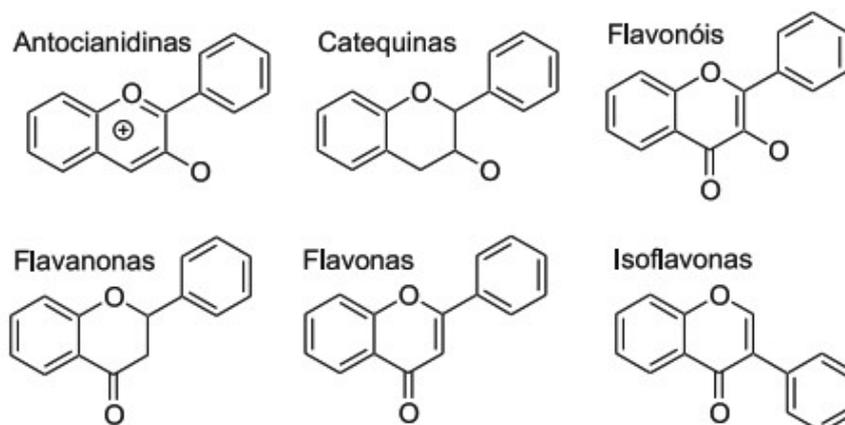
Figura 4 – Estrutura química dos flavonoides.



Fonte: Angelo e Jorge (2007).

De acordo com Rodrigues da Silva et al. (2015), existem 14 tipos de flavonoides, sendo que a maioria dos compostos identificados pertence a apenas seis classes: flavonas, flavanonas, flavonóis, catequinas, isoflavonas e antocianidinas. Esta subdivisão é estabelecida conforme o estado de oxidação da cadeia heterocíclica do pirano (C). A Figura 5 demonstra a estrutura química destas 6 classes de flavonoides.

Figura 5 – Estrutura química das principais classes de flavonoides.



Fonte: Março et al. (2008).

Os flavonoides possuem diversas atividades biológicas, auxiliando nos processos anti-inflamatórios, antivirais, antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, entre outros (SELEEM et al., 2016). Vários estudos vêm sendo realizados visando confirmar o poder anti-inflamatório dos flavonoides frente a doenças pulmonares, como a fibrose pulmonar intersticial, asma e sarcoidose pulmonar (COUTINHO et al. 2009) e como preventivos do sistema nervoso quanto ao envelhecimento ou ferimento cerebral (MATIAS et al., 2016). O resveratrol, por sua vez, em baixas doses promove a saúde cardíaca, agindo como agente de prevenção de doenças ou como tratamento, nos casos de infartos (GEORGE et al., 2016).

### 3.3.3 Antocianinas

O termo antocianinas tem origem no Grego *anthos*, que significa flor, e *kyanos*, azul, sendo utilizado desde o século 18 para descrever pigmentos encontrados em flores e frutos, com espectro variando do vermelho ao azul-violeta, dependendo do pH do meio em que se encontram (BUENO et al., 2012). Também são responsáveis pela cor das folhas das árvores no outono (GLOVER e MARTIN, 2012) e estão normalmente localizados em solução nos vacúolos da epiderme ou em organelas específicas denominadas antocianoplastos.

As antocianinas correspondem ao mais importante grupo de pigmentos hidrossolúveis de origem vegetal (HARBORNE e WILLIAMS, 2000; DOMINGUINI et al., 2014). Uma das principais funções destes pigmentos é atrair os agentes polinizadores e dispersores de sementes, agindo também na proteção da planta frente a processos oxidativos relativos à luz (radiação UV), geralmente nas fases iniciais do seu desenvolvimento (EIBOND et al., 2004).

O consumo de alimentos ricos em antocianinas auxilia na prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e alguns tipos de câncer. Sua presença em vegetais normalmente é relacionada com as vitaminas A, B1, B6, C e E (GLOVER e MARTIN, 2012).

As antocianinas podem ser encontradas em várias famílias de vegetais: *Vitaceae* (uva), *Rosaceae* (cereja, ameixa, framboesa, morango, amora, etc.), *Solanaceae* (tamarindo, batata), *Saxifragaceae* (groselha preta e vermelha), *Ericaceae* (mirtilo), *Cruciferae* (repolho roxo, rabanete), *Leguminoseae* (vagem) e *Myrtaceae* (araçá-vermelho) (JACKMAN e SMITH, 1996). As principais fontes de antocianinas nos alimentos estão citadas na Tabela 3.

Na produção alimentícia, as antocianinas possuem a função de corante, sendo utilizadas em soluções ácidas na elaboração de refrigerantes, doces, produtos de confeitaria, refrescos, pó para refrescos, coberturas de bolo, gelatinas e geleias (BARROS e STRINGHETA, 2006).

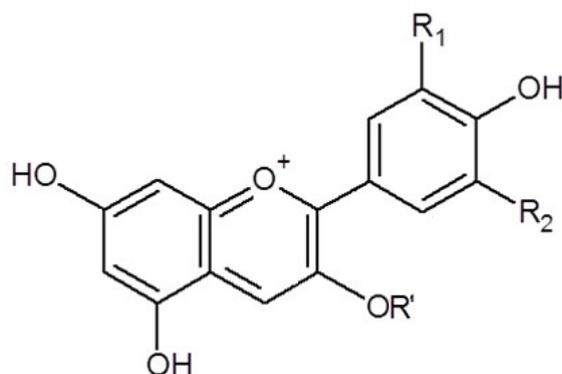
Tabela 3 – Antocianinas mais frequentes em alimentos e suas fontes.

| Antocianinas                                 | Fontes  |
|--|---|
| Cianidina-3-glicosídeo                       | Uva, vinho, cereja, morango, maçã, jabuticaba |
| Cianidina-3,5-diglicosídeo                   | Uva, vinho, cereja, figo, marmelo             |
| Peonidina-3-glicosídeo                       | Uva, vinho, cereja, jabuticaba                |
| Malvidina-3-glicosídeo                       | Uva, vinho                                    |
| Malvidina-3,5-diglicosídeo                   | Uva, vinho, feijão, inhame                    |
| Cianidina-3-galactosídeo                     | Maçã, cacau                                   |
| Cianidina-3p-cumarilsoforosídeo-5-glicosídeo | Repolho roxo                                  |
| Pelargonidina-3-soforosídeo-5-glicosídeo     | Rabanete                                      |
| Pelargonidina-3-glicosídeo                   | Morango, tamarindo                            |
| Delfinidina-3,5-diglicodídeo                 | Berinjela, feijão, uva, romã                  |
| Delfinidina-3-cafeoilglicosídeo-5glicosídeo  | Beringela                                     |
| Petunidina-3-glicosídeo                      | Uva, vinho, feijão, mirtilo, laranja          |

Fonte: Malacrida e Motta (2006).

Estruturalmente, as antocianinas são pigmentos hidrossolúveis derivados das antocianidinas (agliconas) e pertencentes à classe dos flavonoides, caracterizadas pelo núcleo básico flavílio (cátion flavílico), que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos condensados por um oxigênio, conforme a Figura 6. Além do núcleo básico, uma ou mais de suas hidroxilas são ligadas à açúcares (R'), geralmente glicose, xilose, arabinose, ramnose e galactose, ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares, aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos (LOPES et al., 2007).

Figura 6 – Estrutura química das antocianinas (cátion flavílio).



Fonte: Adaptado de Del Rio (2013).

O cátion flavílio por si não é considerado uma antocianina, pois necessita ter substituições nos anéis aromáticos, nas posições representadas pelos radicais R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> (DOMINGUINI et al., 2014). As substituições e os compostos que são gerados (e suas respectivas cores) estão indicados na Tabela 4.

Tabela 4 – Grupos substituintes de hidroxilas do cátion flavílio encontradas na natureza e importantes em alimentos.

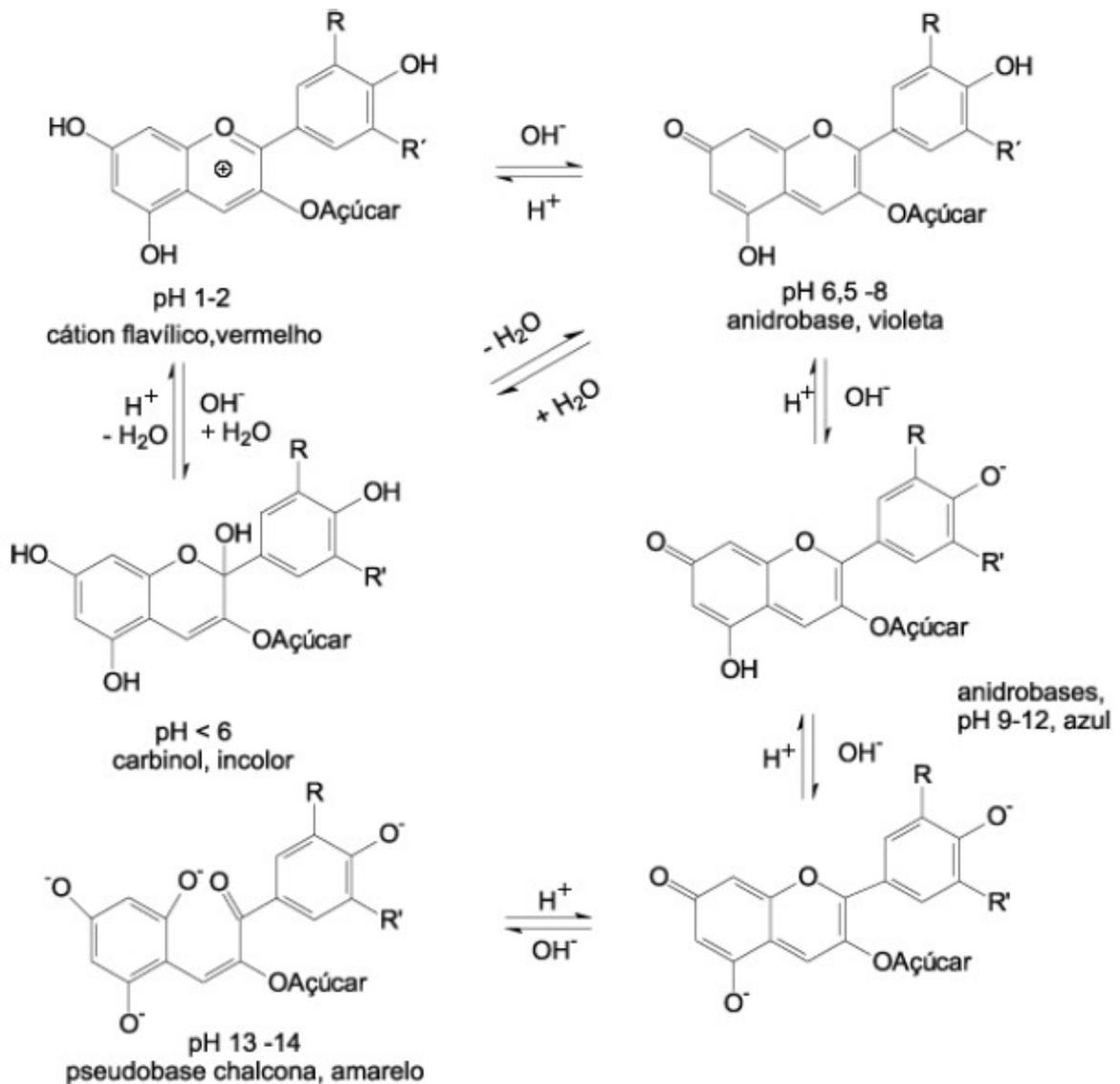
| <b>Antocianina</b> | <b>R<sub>1</sub></b> | <b>R<sub>2</sub></b> | <b>Cor</b>        |
|--------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| Pelargonidina      | H                    | H                    | Laranja ou Salmão |
| Cianidina          | OH                   | H                    | Vermelho          |
| Delfinidina        | OH                   | OH                   | Magenta           |
| Peonidina          | OCH <sub>3</sub>     | H                    | Roxo ou azul      |
| Petunidina         | OCH <sub>3</sub>     | OH                   | Roxo              |
| Malvinidina        | OCH <sub>3</sub>     | OCH <sub>3</sub>     | Roxo              |

Fonte: Adaptado de Fang (2015).

As diferenças entre as várias antocianinas estão no número de grupos hidroxílicos da molécula, no grau de metilação destes grupos, na natureza e no número de açúcares ligados a elas (e na posição destas ligações), bem como na natureza e no número de ácidos alifáticos e/ou aromáticos ligados à parte glicosídica da molécula de antocianina (MARÇO et al., 2008).

Uma característica importante das antocianinas é a de apresentar diferentes estruturas em função do pH, o que confere também a elas o amplo espectro de cores. Em meio ácido (pH 1 a 2), as antocianinas apresentam coloração avermelhada, devido à predominância do cátion flavílico. Com o aumento do pH (2 a 6), ocorre oxidação da estrutura e o vermelho vívido vai se tornando incolor pela formação da espécie pseudobase carbinol. Em valores de pH entre 6,5 e 12, ocorre a formação de anidrobases, que tornam a cor do meio violeta entre 6,5 e 8 ou azul (pH entre 9 e 12). Em pHs superiores à 12, ocorre a ruptura do anel heterocíclico e a formação de chalconas, tornando a coloração do meio amarelada. Nesta última faixa de pH, pode ocorrer precipitação, o que torna a reação irreversível (BOBBIO e BOBBIO, 2001). As Figuras 7 e 8 apresentam as possíveis mudanças estruturais e de coloração das antocianinas em função do pH do meio em que se encontram.

Figura 7 – Possíveis mudanças estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH do meio em que se encontram.



Fonte: Sampaio (2008).

Figura 8 – Mudanças na coloração das soluções aquosas de antocianinas em diferentes valores de pH.



Fonte: DidacForner (2016).

### 3.3.3.1 Estabilidade das antocianinas

As antocianinas são pigmentos relativamente instáveis, e sua estabilidade é afetada por vários fatores, tais como: pH, temperatura, enzimas, presença de ácido ascórbico, exposição à luz, presença de oxigênio, dióxido de enxofre e íons metálicos (RIBEIRO e SERAVALI, 2007). A estrutura insaturada das antocianinas acaba por torná-las muito suscetíveis ao oxigênio molecular, provocando o escurecimento do meio e a aceleração da sua descoloração (DAMODARAN et al., 2010).

O pH influencia diretamente a estabilidade das antocianinas. Sabe-se que valores de pH entre 1 e 3 (ácidos) são ideais para a manutenção da sua estrutura química, porém soluções muito ácidas na presença de agentes oxidantes afetam a sua estabilidade. Em valores de pH elevados, a coloração do meio muda para amarelo devido à reação irreversível de formação de chalconas (TERCI e ROSSI, 2002). A presença de luz, aliada a pHs entre 3 e 3,8, também favorece a degradação dos pigmentos (LOPES et al., 2007).

A temperatura é um dos fatores que mais influenciam na degradação de antocianinas. Em temperaturas elevadas (acima de 60 °C), ocorre a polimerização da molécula, transformando-a em chalcona e tornando a solução amarela (FANG, 2015).

O ácido ascórbico também promove a degradação das antocianinas, porém estes dois compostos reagem mutuamente, inativando as propriedades dos dois compostos. Já o dióxido de enxofre serve como agente protetor para a inibição da degradação provocada por enzimas, entretanto deve ser utilizada em concentrações máximas de 500-2000 ppm, pois acima deste teor um composto incolor com as antocianinas é formado (RIBEIRO e SERAVALI, 2007).

Entretanto, concentrações elevadas de açúcares, presença de íons metálicos de cálcio, ferro, alumínio e estanho, auto-associação entre diferentes antocianinas e copigmentação com outros compostos orgânicos (proteínas, taninos e outros flavonoides) promovem a estabilidade da estrutura química das antocianinas (DAMODARAN et al., 2010).

### 3.3.3.2 Fatores que afetam a extração de antocianinas

A extração de antocianinas pode ser afetada por vários fatores, entre eles a relação massa de matéria-prima/volume de solvente, a temperatura de processo, o tipo de solvente aplicado e o tipo de ácido utilizado para manter o pH baixo durante a extração (CONSTANT, 2003).

As antocianinas estão localizadas nas células epiteliais dos vegetais, e são facilmente extraídas através de solventes orgânicos polares. Tradicionalmente, soluções acidificadas de metanol, etanol, acetona, água e misturas de acetona/metanol/água têm sido utilizadas para a sua extração (JU e HOWARD, 2003), uma vez que a acidificação do solvente tem por objetivo a desnaturação das membranas celulares, favorecendo o processo.

O metanol é caracterizado como o melhor solvente extrator de antocianinas, entretanto, é tóxico. Sua utilização não é recomendada para extratos aplicáveis nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (SAMPAIO, 2008). O etanol, por sua vez, não é tóxico, possui baixo custo, e assim como o metanol também é responsável por bons rendimentos de extração (FULEKI e FRANCIS, 1968).

A concentração do solvente também é um fator que influencia no rendimento da extração. Segundo Gómez-Plaza et al. (2006), água e solventes hidroalcoólicos são os mais recomendados quando o objetivo é obter corantes ou produtos antioxidantes que serão utilizados na indústria de alimentos.

Devido à sua instabilidade frente ao aumento de temperatura, é aconselhável que a extração de antocianinas não ocorra em temperaturas superiores à 60 °C, sendo ideal que o processo seja realizado abaixo de 40 °C, pois temperaturas superiores podem promover rápida degradação térmica e, conseqüentemente, redução da estabilidade e concentração das antocianinas nos extratos (FAVARO, 2008). É muito comum a extração de antocianinas em temperaturas baixas, como nos estudos de Medina et al. (2011), Fuleki e Francis (1968) e Teixeira et al. (2008).

### 3.3.4 Carotenóides

Os carotenóides correspondem a um grande grupo de pigmentos lipossolúveis sintetizados por vegetais, algas e bactérias fotossintetizantes (RIBEIRO, 2011). São responsáveis pela coloração amarela, laranja ou vermelha de muitos vegetais, em especial dos frutos e flores. Estão localizados nos cloroplastos, onde encontram-se associados a proteínas e geralmente são mascarados pela clorofila, e nos cromoplastos, onde apresentam-se na forma cristalina ou como gotículas de óleo. Suas funções básicas nos vegetais englobam a fotoproteção durante a fotossíntese e a estabilização de membranas (SILVA et al., 2010).

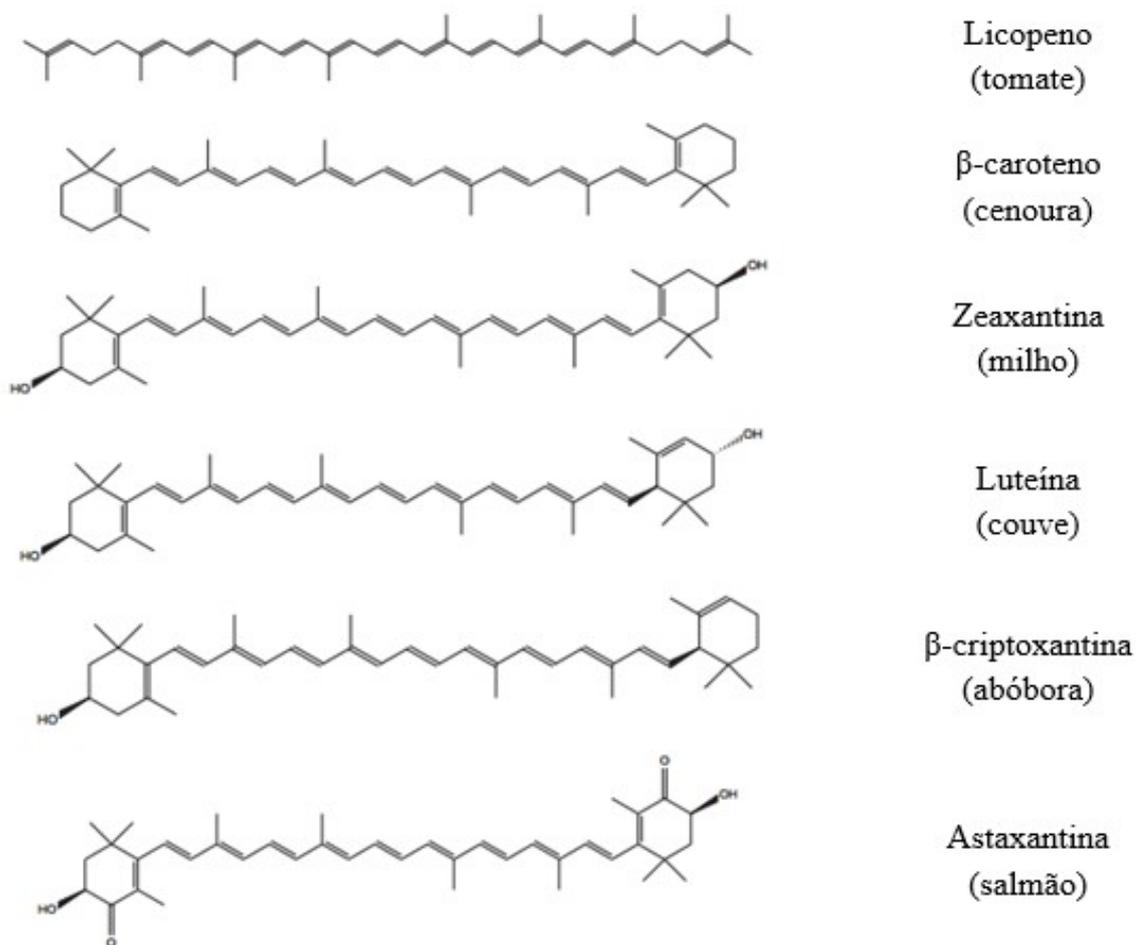
Estudos epidemiológicos vêm demonstrando que o consumo de frutos e vegetais ricos em carotenóides está associado a uma menor incidência de doenças degenerativas como o câncer (em especial mama e próstata), doenças cardiovasculares, degeneração macular

relacionada à idade, formação de catarata (KOBORI, 2010). Isto é devido à sua importante atividade antioxidante, além da ação como provitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

A maioria dos carotenóides são tetraterpenoides ( $C_{40}$ ) compostos de 8 unidades de isoprenos, ligados de tal forma que a estrutura molecular é linear e simétrica, podendo conter de 3 a 15 duplas ligações conjugadas (VALDUGA et al., 2009). O comprimento da cadeia determina o espectro de absorção e a cor da molécula. Todas são baseadas em 7 diferentes grupos terminais, dos quais somente 4 ( $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$  e  $\psi$ ) são encontradas em carotenóides de vegetais (FRASER e BRAMLEY, 2004).

Os carotenóides podem ser classificados em carotenos, compostos somente de carbono e átomos de hidrogênio, ou xantofilas, compostos de carbono, hidrogênio e pelo menos um átomo de oxigênio (Figura 9). Como exemplo do grupo de carotenos pode-se citar o  $\beta$ -caroteno, o  $\alpha$ -caroteno, e o licopeno, e para as xantofilas a zeaxantina, luteína, cantaxantina, astaxantina e  $\alpha$  e  $\beta$ -criptoxantina (RIBEIRO, 2011).

Figura 9 – Estruturas químicas dos principais carotenóides (carotenos e xantofilas).



Fonte: Adaptado de Monego et al. (2017) e Wahyuono et al. (2016).

### 3.4 Métodos de extração de compostos bioativos

A extração é uma operação unitária que envolve transferência de massa e objetiva, basicamente, a separação de compostos de interesse de uma matriz, seja ela sólida ou líquida através de processos químicos, físicos e/ou mecânicos. Os processos podem ser realizados em meio sólido-líquido, líquido-líquido ou gás-líquido (VIEIRA, 2015).

Os métodos de extração, especificamente para matrizes vegetais, devem ser escolhidos de acordo com a estrutura a ser utilizada (raiz, caule, folhas, frutos, sementes) e também com o composto que se deseja extrair. Os processos mais comuns englobam desde métodos convencionais como arraste, prensagem, maceração (NOVELLO, 2015) até métodos que envolvem maior tecnologia, como fluido pressurizado e extração assistida por ultrassom ou micro-ondas (VIEIRA, 2015).

A escolha do método de extração está vinculada à estrutura e composição da matriz, por isso é fundamental o conhecimento das propriedades dos compostos de interesse e seu comportamento frente à diferentes solventes, quando estes são empregados (KOTOVICZ, 2014).

#### 3.4.1 Extração convencional por maceração

Os processos convencionais como a extração por maceração fundamentam-se na utilização de um solvente para extrair os compostos de interesse de um soluto ou matriz, associado ou não ao uso do calor e agitação.

As vantagens deste processo estão no baixo custo operacional e de capital, pois utiliza geralmente equipamentos simples e temperaturas próximas à ambiente (KOTOVICZ, 2014). Entretanto, possuem desvantagens como elevados tempos para se alcançar a concentração máxima do composto de interesse, grande demanda de solvente e degradação térmica devido ao tempo elevado de processo (WANG e WELLER, 2006).

#### 3.4.2. Extração assistida por ultrassom (US)

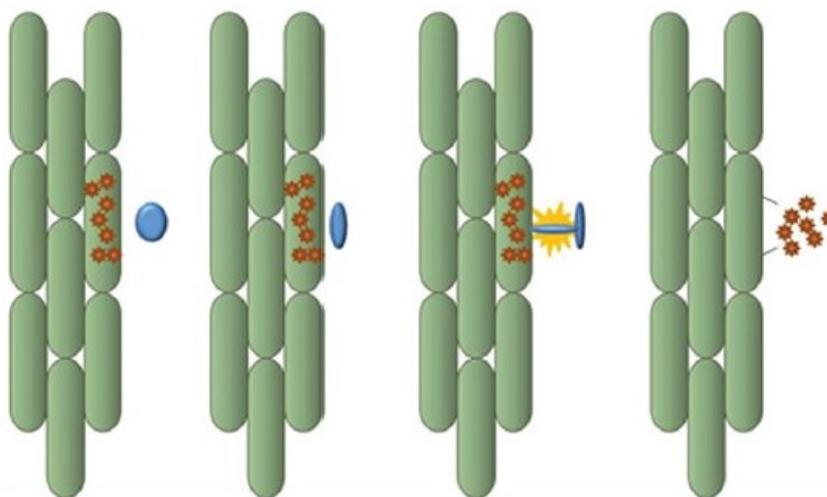
A extração assistida por ultrassom (US) consiste na aplicação de ondas mecânicas em uma frequência acima do limiar da audição humana ( $> 20$  KHz). Estas ondas são geradas através de um transdutor, que converte energia elétrica em energia mecânica. Dentre as vantagens apresentadas por este método frente aos métodos convencionais estão o menor

tempo de processo, o consumo baixo de solvente e a alta reprodutibilidade dos ensaios (CHEMAT et al., 2011).

A utilização do ultrassom visa intensificar a extração por meio de um fenômeno denominado cavitação, onde os efeitos causados pelas ondas ultrassônicas criam um ciclo de bolhas de gás e cavidades no líquido solvente (VARDANEGA et al., 2014). Quando ocorre o colapso das bolhas, são geradas ondas de energia muito elevadas na zona de cavitação. Caso este processo ocorra próximo à parede celular da matriz vegetal, a energia gerada exerce um forte impacto sobre a superfície sólida, aumentando assim a permeabilidade da parede celular, favorecendo a entrada do solvente, conforme demonstra a Figura 10. Esse processo irá aumentar o processo de difusão e reforçar a transferência de massa (PATIST e BATES, 2008). Aliada à cavitação, o calor liberado no colapso das bolhas aumenta a solubilidade dos analitos, aumentando a eficiência da extração (CAVALHEIRO, 2013).

A extração assistida por ultrassom pode ser realizada em diversos equipamentos, sendo que os mais utilizados são o banho e a sonda ultrassônica. O banho ultrassônico é um método indireto, onde as ondas são propagadas através do recipiente da amostra, enquanto que a sonda age diretamente na matriz e no solvente (CHEMAT et al., 2011).

Figura 10 – Processo de cavitação promovida pela extração assistida por ultrassom (US).



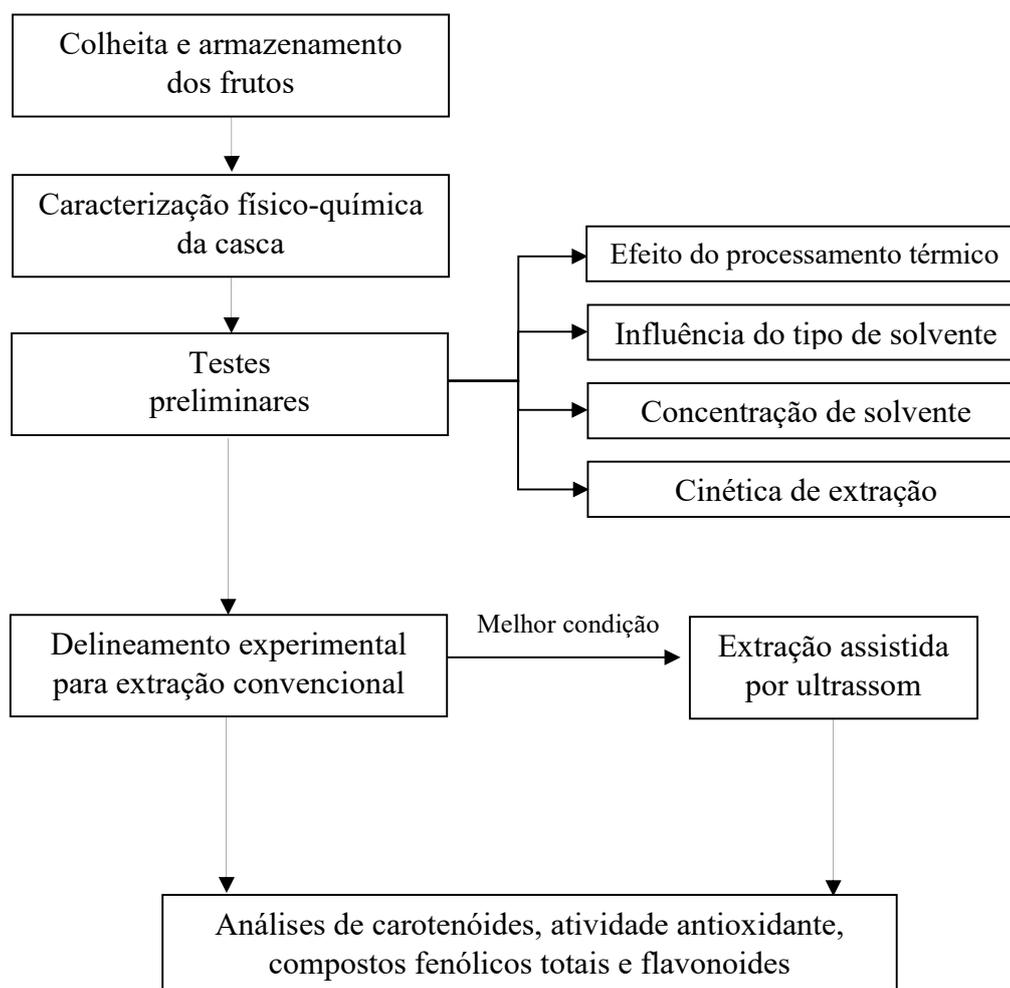
Fonte: Vardanega et al. (2014).

A extração assistida por US tem sido empregada com sucesso em processos de extração de antocianinas de cascas de fruta, em especial de romã (PAN et al., 2011), uva (CARRERA et al., 2012), jabuticaba (SANTOS et al., 2010), entre outros.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão apresentados os materiais e métodos utilizados na caracterização físico-química do araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine), na extração de antocianinas totais (AT) sob diferentes métodos e na quantificação dos compostos bioativos dos extratos. A Figura 11 apresenta a sequência de etapas deste estudo.

Figura 11 – Fluxograma apresentando as etapas desenvolvidas na pesquisa.



Inicialmente, foi realizada a colheita e armazenamento dos frutos. A caracterização físico-química das cascas do araçá-vermelho foi a segunda etapa. Como próxima atividade, alguns testes preliminares foram executados visando identificar qual processamento da casca (descongelamento ou secagem), solvente (etanol ou metanol) e concentração destes apresentariam os maiores resultados para o teor de AT. Definido isto, construiu-se uma curva de cinética de extração para avaliar o teor de AT em função ao tempo. A seguir, foi realizado um planejamento de experimentos cujo objetivo foi a otimização do processo de extração pela

metodologia convencional. Após o estabelecimento das condições ótimas, foi realizada uma extração assistida por ultrassom com construção de curva de cinética para verificar a variação do teor de AT em relação ao tempo, fornecendo subsídios para comparação com o método convencional.

Por fim, carotenóides, compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos obtidos pelos dois métodos foram quantificados e logo após comparados. A seguir, as etapas são detalhadas.

#### 4.1 Colheita e armazenamento dos frutos

Os frutos de araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) foram colhidos diariamente durante o período de janeiro a março de 2016, nas coordenadas -27.841692°, -52,302515°. Definiu-se, após avaliação visual, que o ponto de colheita ideal seria quando a porção inferior do fruto, ou seja, aquela que está ligada ao caule, estivesse com a coloração uniforme característica do araçá (Figura 12).

Figura 12 – Araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) no ponto de colheita.



Fonte: Autora (2016).

Após a colheita, os frutos foram selecionados manualmente, eliminando os avariados que porventura não tenham sido percebidos durante a colheita. Procedeu-se então uma lavagem com água corrente e imersão por 15 minutos em solução de NaClO a 200 ppm. Em seguida, os frutos foram enxaguados e retirou-se a umidade externa com auxílio de papel toalha.

Os frutos foram acondicionados em embalagens de polietileno contendo a indicação de peso e data de colheita, e congelados à -10 °C.

## 4.2 Caracterização físico-química da casca

A caracterização físico-química das cascas do arará-vermelho foi realizada a partir das análises de: umidade, lipídios, proteína, resíduo mineral fixo, carboidratos totais, pH e sólidos solúveis. As análises foram realizadas nos laboratórios da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI – Erechim e do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS – Campus Erechim, sendo os resultados apresentados como média dos resultados  $\pm$  desvio-padrão.

### 4.2.1 Umidade

A umidade foi determinada pelo método de dessecação em estufa (Luccadema, modelo Lucca-001) com circulação de ar, à temperatura de 105 °C, segundo metodologia 012/IV descrita pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005).

### 4.2.2 Lipídios

O extrato etéreo foi determinado através do método 032/IV do Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005), em extrator Soxhlet (Marconi modelo MPA 491/6), utilizando éter de petróleo P.A. (Dinâmica<sup>®</sup>) como solvente extrator.

### 4.2.3 Proteínas

O teor de proteínas foi determinado segundo AOAC 991.20 (2005), através do método de Kjeldahl – determinação do teor de nitrogênio da amostra, em três etapas: digestão da amostra (bloco digestor Lucadema modelo 341/2), destilação e titulação.

### 4.2.4 Resíduo mineral fixo (RMF)

O resíduo mineral fixo foi determinado através do método 018/IV do Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005), com carbonização realizada em 200 °C (A. Científica modelo EEQ9012D-2), seguida de incineração em mufla (Zezimaq modelo 004) a 550°C.

#### 4.2.5 Carboidratos totais (CT)

Os carboidratos totais foram determinados pela diferença dos demais constituintes da composição físico-química, conforme a RDC nº 360 (BRASIL, 2003), conforme a Equação 1.

$$CT(\%) = 100 - [umidade(\%) + proteínas(\%) + RMF(\%) + lipídios(\%) + fibras(\%)] \quad (1)$$

#### 4.2.6 pH

O pH foi medido por meio de pHmetro de bancada (TecnoPON, modelo mPA-210) por leitura direta nas cascas trituradas e diluídas em água destilada, conforme metodologia descrita no Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005).

#### 4.2.7 Sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis foi medido por refratômetro portátil (Incoterminas, modelo PYREF82), também a partir da metodologia descrita no Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). Os resultados foram expressos em °Brix.

### 4.3 Testes preliminares

Poucos são os estudos relatados até o momento utilizando como matéria-prima o araçá-vermelho. Além disto, a extração de antocianinas é um processo que envolve vários parâmetros. Por isso, alguns testes preliminares foram realizados a fim de servir como base para a posterior realização de planejamento de experimentos visando a otimização da extração.

#### 4.3.1 Efeito do processamento térmico

Para avaliar se o processamento térmico influencia na extração de antocianinas totais (AT), a casca do araçá foi preparada de duas formas para as análises: *in natura* (após descongelamento) e submetida à processo de secagem.

Os frutos foram descongelados em refrigerador (Electrolux modelo DC47), a uma temperatura de 8 °C, até perderem a consistência firme característica do congelamento. Em seguida, procedeu-se a separação da casca com auxílio de uma faca. A polpa e as sementes não foram utilizadas. As cascas foram trituradas em moinho (Solab modelo SL-01) e imediatamente encaminhadas para extração.

Já para as amostras secas, as cascas foram acondicionadas em bandejas de inox em estufa com circulação de ar (Lucadema LUC-01), com temperatura de  $38 \pm 1$  °C, para evitar a perda de compostos voláteis. Durante o processo, as amostras foram pesadas (Shimadzu modelo AUX220) para avaliação do tempo necessário para completa remoção da água livre (umidade de equilíbrio) e para a construção da curva de cinética de secagem. Após a secagem, as amostras foram então trituradas em moinho (Solab modelo SL-01) e seguiram para a extração.

#### *4.3.2 Extração e quantificação de antocianinas totais*

A metodologia de extração seguiu Medina et al. (2011), com algumas modificações: Cinco gramas de cada amostra foram pesados (Shimadzu modelo AUX220) e acondicionados em tubos de Falcon de 25 mL, cobertos com papel alumínio. Adicionou-se a seguir 10 mL do solvente a 4°C (contendo 0,1 % de HCl P.A.). A extração ocorreu no escuro, sob refrigeração (Electrolux modelo DC47), durante 2 h e à temperatura de  $4 \pm 1$  °C. Transcorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas (MPW modelo MPW-351R) a 8000 rpm por 15 min e sob refrigeração. O sobrenadante foi recolhido e foram realizadas duas lavagens do precipitado com 5 mL de solvente, seguidas de centrifugações nos mesmos parâmetros da primeira operação.

O extrato foi então filtrado à vácuo filtro de papel Whatmann n° 01 e funil de Buchner, e o volume de cada amostra foi padronizado para 20 mL. A seguir, os extratos foram acondicionados em frasco âmbar cobertos com papel alumínio e imediatamente encaminhados para a quantificação de antocianinas a partir de análise colorimétrica. Depois da leitura da absorbância, os extratos foram secos em capela de exaustão até remoção do solvente, e conservados a -8 °C.

A quantificação das antocianinas baseou-se no método descrito por Fetter et al. (2010), onde a leitura da absorbância foi realizada a 535 nm, em espectrofotômetro (Agilent modelo 8453E), utilizando os solventes como branco.

O cálculo do teor de AT foi realizado para todos os experimentos, independente da metodologia de extração. O método baseou-se na interpolação da regressão linear tangente à curva padrão de cianidina-3-glicosídeo comercial (Sigma-Aldrich®). Este composto foi escolhido por ser o componente majoritário do grupo das antocianinas no araçá-vermelho (BIEGELMEYER et al, 2011; MEDINA et al., 2011). A curva padrão foi construída com diferentes concentrações da cianidina-3-glicosídeo comercial (1, 5, 10, 15 e 20 ppm) e está apresentada na Figura IA do Apêndice I.

#### *4.3.3 Influência do tipo e concentração de solvente*

Para verificar a influência do tipo de solvente sobre a extração de antocianinas totais AT, foram realizadas extrações com etanol absoluto P.A. (Merck®) e metanol P.A. (Vetec®), ambos acidificados com 0,01% de ácido clorídrico P.A. (Vetec®).

Após a definição do tipo de solvente, foram realizados ensaios com diferentes concentrações deste (30, 50, 70, 90 e 100%) para buscar um intervalo em que os resultados apresentassem os maiores teores de AT, definindo assim uma faixa de concentrações para o planejamento de experimentos.

#### *4.3.4 Cinética do tempo de extração via método convencional*

Após definido o tipo e a concentração de solvente, avaliou-se a cinética de extração das antocianinas para verificar em qual tempo a concentração de AT torna-se estável no extrato, e se ocorre degradação do composto ao longo da extração. Este ensaio é importante pois evita que o processo seja realizado por tempo além do necessário, o que acarreta em maiores custos ou perda do composto de interesse.

Para esta análise, 8 g de amostra foram adicionadas a 40 mL de solvente e mantidas no escuro a 4 °C. Nos tempos 1, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 min, 1 mL do sobrenadante foi retirado, centrifugado (Hettich modelo 200424) e lido em espectrofotômetro (Agilent modelo 8453E) a 535 nm. As alíquotas retiradas foram descartadas após as leituras. O cálculo do teor de AT foi igual ao da extração (item 4.3.2).

#### 4.4 Delineamento experimental

Após a definição do solvente a ser empregado e sua concentração e do tempo de extração, foram realizados 2 delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR), visando a otimização do processo de extração de antocianinas da casca do araçá-vermelho.

##### 4.4.1 Efeito da agitação e relação massa de amostra/volume de solvente

Os experimentos foram realizados a partir de um planejamento fatorial completo – DCCR 2<sup>2</sup>, onde a agitação (X<sub>1</sub>) e a relação massa de amostra/volume de solvente (X<sub>2</sub>) foram estabelecidas como variáveis independentes para verificação dos seus efeitos sobre a extração. Com base na metodologia de Medina et al. (2011), as variáveis fixas de extração foram tempo de 2 h, solvente etanol a 90% (em H<sub>2</sub>O) acidificado com 0,1% de HCl e temperatura de 4 °C. A agitação foi proporcionada por agitador orbital (Nova Ética modelo 430RDB). O esquema experimental incluiu 4 pontos axiais e triplicata do ponto central, totalizando 11 ensaios. Os níveis de variações e as variáveis independentes estão citados na Tabela 5.

Tabela 5 – Variáveis independentes e níveis (valores reais e codificados) utilizados no delineamento composto central rotacional para o teor de antocianinas totais da casca do araçá-vermelho.

| Variáveis independentes   | Níveis |      |      |      |        |
|---|--------|------|------|------|--------|
|   | -1,41  | -1   | 0    | 1    | 1,41   |
| Agitação (rpm) – X <sub>1</sub>                                     | 40     | 50   | 75   | 100  | 110    |
| Relação massa de amostra/volume de solvente (g/mL) – X <sub>2</sub> | 0,6/10 | 1/10 | 2/10 | 3/10 | 3,4/10 |

##### 4.4.2 Efeito do pH e temperatura

Quando há um número grande de variáveis envolvidas no estudo, e principalmente no caso de matrizes vegetais pela sua variabilidade, é necessária uma estratégia sequencial de planejamentos em direção a condição desejada. Por isso, foi realizado um segundo planejamento experimental.

Os experimentos para avaliar o efeito do pH e da temperatura foram realizados a partir de um planejamento fatorial completo DCCR 2<sup>2</sup>, onde pH ( $X_1$ ) e temperatura ( $X_2$ ) foram estabelecidos como variáveis independentes. As variáveis fixas de extração foram tempo de 2 h, solvente etanol a 90%, temperatura de 4 °C, relação massa de amostra/volume de solvente de 1 g/10 mL e sem agitação. O esquema experimental inclui 4 pontos axiais e triplicata do ponto central, totalizando 11 ensaios. Os níveis e as variáveis independentes estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Variáveis independentes e níveis (valores reais e codificados) utilizados no DCCR para o teor de antocianinas totais da casca do araçá-vermelho.

| Variáveis independentes  | Níveis |    |     |    |      |
|--------------------------|--------|----|-----|----|------|
|                          | -1,41  | -1 | 0   | 1  | 1,41 |
| pH – $X_1$               | 0,8    | 1  | 1,5 | 2  | 2,21 |
| Temperatura (°C) – $X_2$ | 4,8    | 15 | 40  | 65 | 75,2 |

Após a otimização do processo de extração convencional, uma nova cinética de extração foi realizada para avaliar os parâmetros.

#### 4.5 Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom foi realizada utilizando-se os parâmetros obtidos nas extrações do método convencional que resultou no maior teor de AT, incluindo concentração de solvente, relação massa de amostra/volume de solvente, tempo, pH e temperatura.

Para a extração, 1g da casca de araçá-vermelho foi pesada e acondicionada em frasco erlenmeyer, onde recebeu 10 mL de solvente. Os frascos foram cobertos com papel alumínio e imersos no banho ultrassônico (Unique modelo USC-1800A) à uma frequência de 50 KHz, potência máxima do equipamento (99W) e temperatura de 40°C. Após 2 h de extração, as amostras foram centrifugadas (MPW modelo MPW-351R), filtradas e tiveram o seu volume ajustado para 20 mL. A leitura colorimétrica foi realizada conforme a metodologia utilizada para as extrações da metodologia convencional. O cálculo do teor de AT foi realizado de acordo com o item 4.3.2.

#### 4.5.1. Avaliação da cinética de extração

A cinética de extração via metodologia assistida por ultrassom foi realizada pelos mesmos parâmetros da avaliação de cinética do método convencional. Para tanto, 8 g de amostra foram adicionadas a 40 mL de solvente. Os frascos foram cobertos com papel alumínio para ausência de luz, e imersos em banho ultrassônico (Unique modelo USC-1800A) à 40 °C e uma frequência de 50 KHz, sem agitação. Nos tempos 1, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 min, 1 mL do sobrenadante foi retirado, centrifugado (Hettich modelo 200424) e lido em espectrofotômetro a 535 nm.

### 4.6 Determinação de compostos bioativos

Para os extratos que apresentaram os maiores teores de AT obtidos do planejamento experimental pelo método convencional e ao empregar o ultrassom, realizou-se as análises de compostos fenólicos totais, flavonoides, carotenóides e atividade antioxidante.

#### 4.6.1 Determinação de compostos fenólicos totais

O teor de fenólicos totais dos extratos da casca de araçá-vermelho foi determinado seguindo metodologia proposta por Singleton et al., (1999) com adequações propostas por Blainski et al. (2013) e Dai e Mumper (2010). O método baseia-se na mudança de cor causada pela redução do reagente Folin-Ciocalteu por fenolatos em carbonato de sódio (LIMA, 2013).

Adicionou-se 0,5 mL da amostra e em seguida 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu a 0,2 N (Vetec<sup>®</sup>) sob agitação em agitador de tubos Vortex (IKA modelo MS 3B). A mistura permaneceu em repouso por 5 min, a temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, foi adicionado à mistura 2 mL de NaCO<sub>3</sub> 5% (Vetec<sup>®</sup>) e 50 µL de LiCl 10% (Synth<sup>®</sup>), incubando por 2 h no escuro e em banho maria (Nova Ética modelo 501D) a 25 °C. A medida de absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Agilent modelo 8453E) a 760 nm. Os resultados foram expressos em Eq.mg de ácido gálico na amostra analisada, após construção de curva de calibração (Apêndice I – Figura IIA) e obtenção da equação da reta com o padrão de ácido gálico comercial (Neon<sup>®</sup>) na concentração de 0,01 a 0,25 mg/mL<sup>-1</sup>.

#### 4.6.2 Determinação de flavonoides

O teor de flavonoides totais dos extratos casca de araçá-vermelho foi determinado de acordo metodologia descrita por Zhishen et al. (1999), onde se adicionou 0,25 mL da amostra em tubo de ensaio com 1,25 mL de água deionizada e 75 µL da solução de NaNO<sub>2</sub> 5% (Synth<sup>®</sup>), agitou-se em agitador de tubos Vortex (IKA modelo MS 3B) e deixou-se a mistura em repouso por 6 min a temperatura ambiente (25 °C). Adicionou-se 150 µL de da solução de AlCl<sub>3</sub> 10 %, agitou-se novamente e a mesma permaneceu em repouso por mais 5 min a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 0,5 mL da solução de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> (Dinâmica<sup>®</sup>) e 2,5 mL de água destilada em agitação (1200 rpm) e a medida foi feita em espectrofotômetro (Agilent modelo 8453E) a 510 nm. Os resultados foram expressos em Eq.mg de catequina/100g de casca de araçá-vermelho após construção de curva de calibração e equação da reta (Apêndice I – Figura IIIA) com padrão de catequina (Vetec<sup>®</sup>) na concentração de 0,01 a 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.6.3 Determinação de carotenóides

O teor de carotenóides totais foi estimado a partir da leitura da absorbância dos extratos em espectrofotômetro (Agilent modelo 8453E) a 448 nm, conforme Equação 2 (DAVIES, 1976). O coeficiente de absorbância utilizado foi referente ao β-caroteno para o etanol: E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup> = 2592. Os resultados da concentração de carotenoides foram expressos em termos de carotenoides totais (µg/mL).

$$C = \frac{ABSc \times v}{E_{1cm}^{1\%} \times 100} \quad (2)$$

Onde:

C = carotenoides totais (µg/mL)

ABSc = absorbância do extrato

v = volume do extrato (mL)

E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup> = coeficiente de extinção específico: 2592 (DAVIES, 1976)

#### 4.6.4 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos obtidos através dos dois métodos de extração foi determinada utilizando a captação do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), que apresenta o máximo de absorção a 515-520 nm. A metodologia utilizada foi de Brand-Williams (1995), com modificações, onde 23,659 mg de DPPH (Sigma-Aldrich®) foi diluído em 1000 mL de metanol (Merck®). Em seguida, 100 µL de cada extrato na concentração 50mg/mL e 3900 µL de DPPH, foram adicionados em tubos de ensaio e agitados em agitador de tubos Vortex (IKA modelo MS 3B). A solução foi mantida ao abrigo da luz por 30 min, e logo após lida em espectrofotômetro a 515 nm. O percentual de eficiência da atividade antioxidante foi calculado a partir da Equação 3, e o valor expresso em % de inibição DPPH.

$$AA\% = 100 - \{[(ABS_{amostra} - ABS_{branco}) \times 100] \div ABS_{controle}\} \quad (3)$$

Onde:

$ABS_{branco}$  = amostra + 3900 µL de metanol

$ABS_{controle}$  = 100 µL de metanol + 3900 µL de DPPH

#### 4.7 Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa *STATISTICA* (versão 5.0). A análise de variância (ANOVA) foi usada para detectar a diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ). Os valores médios foram comparados entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade de erro ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente item tem por objetivos apresentar e discutir os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, o qual primeiramente apresenta a caracterização físico-química da casca do araçá-vermelho, seguido da extração de antocianinas totais através das metodologias convencional e assistida por ultrassom, a quantificação dos compostos bioativos e comparação entre os dois métodos de extração pesquisados.

### 5.1 Caracterização físico-química da casca

Os valores de umidade, carboidratos totais, extrato etéreo, proteínas, resíduo mineral fixo, pH e sólidos solúveis da casca do araçá-vermelho estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores médios e desvio padrão das análises físico-químicas da casca do araçá-vermelho.

| <b>Composição Química</b>      | <b>Média ± Desvio</b> |
|--------------------------------|-----------------------|
| Umidade – %                    | 78,85 ± 0,03          |
| Carboidratos totais – %        | 11,19 ± 0,02          |
| Extrato etéreo – %             | 0,17 ± 0,03           |
| Proteínas – %                  | 4,31 ± 0,05           |
| Resíduo mineral fixo (RMF) – % | 5,88 ± 0,02           |
| pH                             | 2,56 ± 0,05           |
| Sólidos solúveis – ° Brix      | 13,33 ± 0,47          |

O teor de umidade da casca do araçá-vermelho obtido neste estudo foi de 78,85% (Tabela 7). Este valor é inferior aos encontrados por Santos et al. (2007) e Silva et al. (2008), que obtiveram 79,6 e 82,36%, respectivamente, ao avaliar o fruto inteiro do araçá-vermelho. Estes resultados sugerem que o teor de umidade dos frutos de araçá-vermelho é superior na polpa do que na casca. Gondim et al. (2005) comparou a composição físico-química das cascas e dos frutos inteiros de 7 espécies brasileiras e, em todas, a umidade calculada da casca foi inferior à do fruto.

Para a análise de carboidratos totais, o valor de 11,19% é inferior aos 26,79% encontrados por Dalla Nora et al. (2014) nos frutos inteiros. Entretanto, corresponde à

segunda maior fração centesimal das cascas, o que sugere que a casca também contribui para o sabor adocicado do araçá-vermelho.

O extrato etéreo de 0,17% é baixo, semelhante aos valores de 0,24% de Santos et al. (2007) e 0,34% de Dalla Nora et al. (2014), o que demonstra o baixo teor lipídico do fruto araçá-vermelho, seja este inteiro ou somente a sua casca. Fato semelhante ocorreu com o resíduo mineral fixo, onde os valores encontrados foram ligeiramente superiores aos de Dalla Nora et al. (2014) com o fruto inteiro, ficando próximo a 6%, o que configura a casca do araçá-vermelho como uma excelente fonte de minerais, como potássio, cálcio, fósforo, magnésio, entre outros (KINUPP e BARROS, 2008). O achado vem de encontro com Gondim et al. (2005), que após as suas análises concluiu que as cascas de frutas apresentam quantidades de nutrientes maiores que as suas respectivas partes comestíveis.

O teor de proteínas encontrado para as cascas foi de 4,31%, superior aos 2,1% obtidos por Mccook-Russel et al. (2012) e 3,77% de Dalla Nora et al. (2014). O valor de pH de 2,56 confere a característica de cor vermelha da casca pela presença do cátion flavílio. Os valores para os frutos inteiros são superiores, conforme Santos et al. (2007) que encontrou o valor de pH de 3,29, e Reissig (2015), de 3,6.

Com relação ao teor de sólidos solúveis, o valor encontrado foi de 13,33 °Brix. O teor de sólidos solúveis é importante nos frutos, pois infere a presença de açúcares na estrutura, essenciais para a estabilidade das antocianinas (CAVALCANTI et al., 2006).

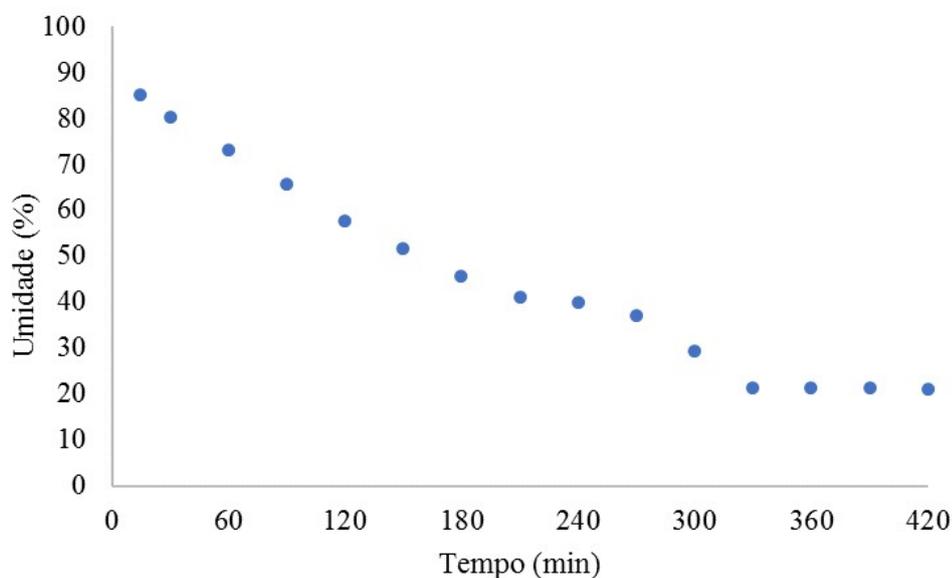
Cabe ressaltar que estudos sobre a composição físico-química da casca do araçá-vermelho não foram encontrados. Desta forma, a comparação com a literatura foi realizada com os resultados obtidos por outros autores na caracterização do fruto inteiro ou de cascas de outros frutos.

## **5.2 Efeito do processamento térmico no teor de antocianinas totais (AT)**

A cinética de secagem das cascas de araçá-vermelho está demonstrada na Figura 13, na qual observa-se que o ponto de umidade de equilíbrio ( $X_E$ ) foi atingido após 320 minutos em estufa de circulação de ar à temperatura de  $38 \pm 1$  °C.

A umidade de equilíbrio ( $X_E$ ) obtida na secagem foi de 78,91%, enquanto que a umidade encontrada na análise apresentada no item 5.1 foi de 78,85%, corroborando com este resultado.

Figura 13 – Cinética da secagem da casca de araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine), realizada em estufa de circulação à temperatura de  $38 \pm 1$  °C.



A Tabela 8 exibe os teores de AT obtidos para os extratos das amostras das cascas *in natura* (descongeladas) e submetidas à secagem.

Tabela 8 – Teor de antocianinas totais da casca do araçá-vermelho sob diferentes processamentos (descongelamento e secagem).

| Amostras                         | Teor de antocianinas totais<br>(Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca) |
|----------------------------------|---|
| <i>In natura</i> (descongeladas) | $34,31^a \pm 0,36$  |
| Secas                            | $5,49^b \pm 0,05$   |

Extração realizada com etanol absoluto acidificado (HCl 0,1%) por 2h à 4°C e relação massa de amostra/volume de solvente de 5g/10mL.

Os teores de AT encontrados para as amostras *in natura* e secas apresentaram diferença significativa entre si, demonstrando que o processamento térmico, mesmo em temperaturas abaixo de 40 °C, provoca a degradação de antocianinas de aproximadamente 84%. Além da temperatura, o tempo e a circulação de ar também pode ter influenciado no resultado, visto que a exposição ao oxigênio também pode degradar as antocianinas. Dalla Nora et al. (2014) também encontrou valores muito inferiores para amostras submetidas à secagem, com uma degradação de 98,3% para amostras que secas a 70 °C. Asami et al. (2003)

atribuiu altas temperaturas e concentrações de oxigênio na secagem à degradação de antocianinas pela oxidação e condensação dos compostos fenólicos.

Após os resultados destas primeiras análises, ficou estabelecido que as cascas de araçá-vermelho passariam apenas por processo de descongelamento e maceração antes das extrações.

### 5.3 Influência do solvente

Os itens a seguir apresentam os teores de antocianinas totais encontrados para os diferentes solventes e concentrações testadas.

#### 5.3.1 Tipo de solvente

O teor de AT obtido na extração com metanol foi 5% maior se comparado com a extração promovida pelo etanol, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 – Teor de antocianinas totais extraídos sob diferentes solventes orgânicos.

| Solvente | Teor de antocianinas totais                      |
|----------|--|
|          | (Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca) |
| Etanol   | 56,57 <sup>a</sup> ± 2,46                        |
| Metanol  | 59,40 <sup>a</sup> ± 0,99                        |

Extração realizada com amostras *in natura* (descongeladas), por 2h à 4°C e relação massa de amostra/volume de solvente de 5g/10mL.

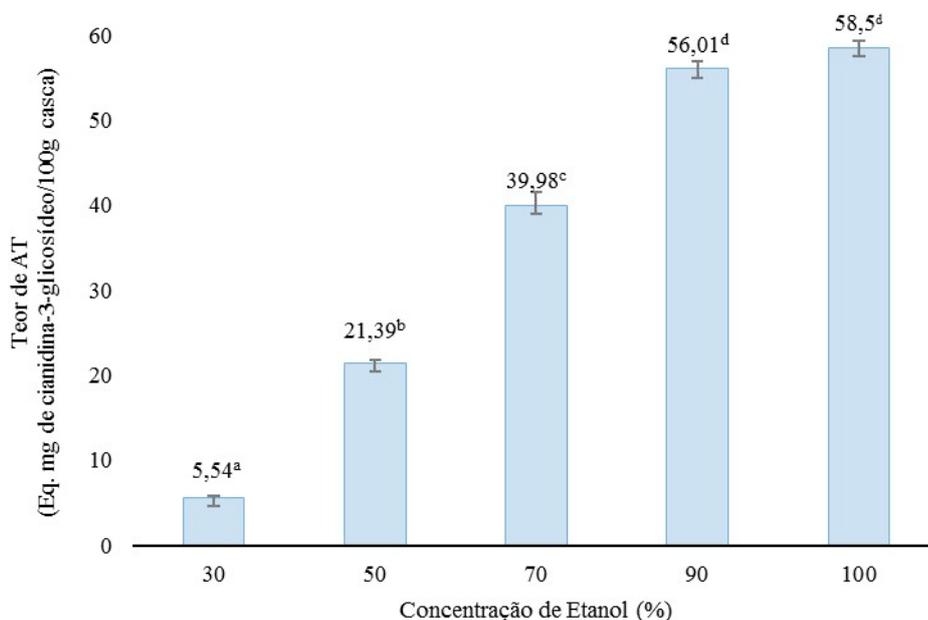
Mesmo com o teor de AT ter sido maior na extração com o solvente metanol, a partir da análise de variância (ANOVA) observou-se que os extratos obtidos com etanol e metanol não diferiram significativamente ao nível de 5%. Terci (2014) concluiu que a extração de antocianinas com o solvente metanol foi 20% superior ao etanol. Entretanto, a partir da análise de variância, também não apresentaram diferença significativa ao nível de 5%. Em seus estudos, Francis (1982) e Montes et al. (2005) também não encontraram diferenças significativas entre os dois solventes para a extração de antocianinas totais.

A partir destes resultados, o etanol foi escolhido como solvente, devido a sua semelhança com o metanol em questão ao teor de AT extraídos e à sua menor toxicidade.

### 5.3.2 Concentração de solvente

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos referentes aos teores de antocianinas totais da casca do araçá-vermelho para as diferentes concentrações de etanol testadas.

Figura 14 – Teor de antocianinas totais (AT) extraídas do araçá-vermelho em função de diferentes concentrações do solvente etanol.



Extração realizada com amostras *in natura* (descongeladas), por 2h à 4°C e relação massa de amostra/volume de solvente de 5g/10mL.

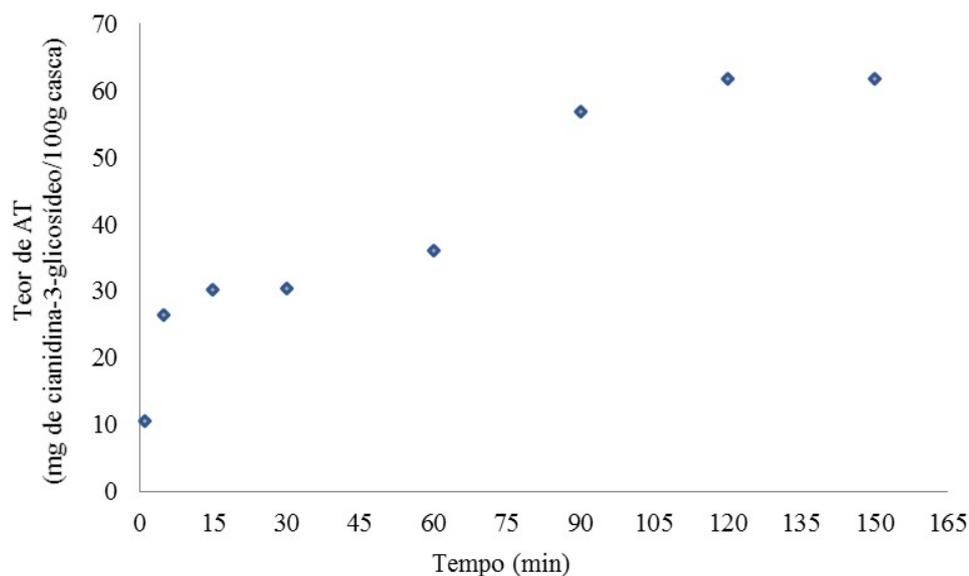
Ao analisar a Figura 14, observa-se que, conforme a concentração de etanol foi aumentando, houve uma maior extração de antocianinas totais. Neste sentido, para estas condições experimentais, as concentrações de etanol que apresentaram os maiores teores de antocianinas foram 90 e 100%. Como estas são iguais ao nível de significância de 5%, definiu-se que a concentração de solvente para as próximas análises seria de 90% (etanol 90:água 10, v/v), acidificada com 0,1% de HCl.

### 5.4 Cinética da extração pelo método convencional

Estabelecidos solvente e concentração, a próxima etapa foi a avaliação da cinética de extração, para verificar o tempo adequado de extração das antocianinas da casca do araçá-vermelho. A Figura 15 demonstra que a máxima extração de antocianinas de 61,82 Eq. mg de

cianidina-3-glicosídeo foi obtida em 120 min. A partir deste tempo, observa-se que a extração torna-se estacionária. Por esta razão, fixou-se o tempo de extração em 120 min. Medina et al. (2011) também realizou extrações de antocianinas totais do fruto araçá-vermelho pelo método convencional durante este mesmo tempo.

Figura 15 – Cinética da extração de antocianinas totais através do método convencional.



Extração realizada com amostras *in natura* (descongeladas), solvente etanol 90% acidificado com 0,01% de HCl e relação massa de amostra/volume de solvente de 5g/10mL, à 4 °C.

## 5.5. Delineamento experimental

### 5.5.1 Efeito da agitação e da relação massa de amostra/volume de solvente

A Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  em relação às variáveis independentes agitação (rpm) e relação massa de amostra/volume de solvente (g/mL), e a respectiva resposta em termos de teor de AT (Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca) encontrado para cada experimento. O maior teor de AT obtido foi de 81,66 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca para o ensaio 7, utilizando agitação de 75 rpm e relação massa de amostra/volume de solvente de 0,6g/10mL, sendo muito semelhante ao teor obtido no ensaio 1, de 79,57 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca, ao empregar 50 rpm e 1 g de amostra para 10 mL de solvente.

Tabela 10 – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  (valores reais e codificados) das variáveis agitação e relação massa de amostra/volume de solvente e respostas do teor de antocianinas totais (AT).

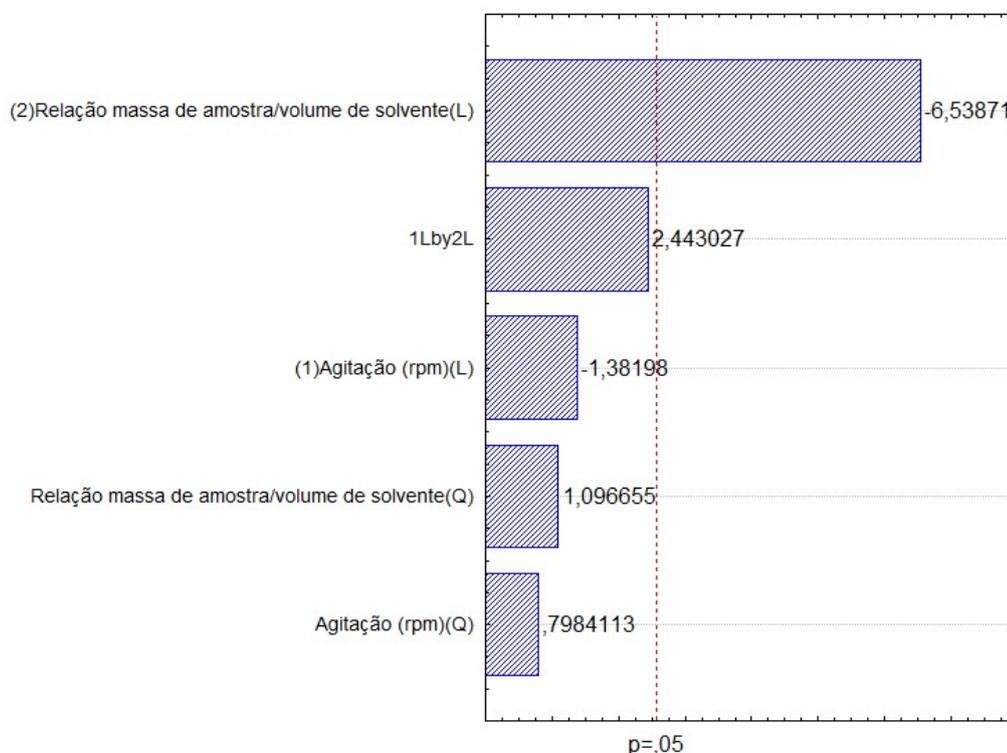
| Ensaio | Variáveis independentes |                | Teor de antocianinas totais<br>(Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca) |
|--------|-------------------------|----------------|---|
|        | X <sub>1</sub>          | X <sub>2</sub> |   |
| 1      | -1 (50)                 | -1 (1/10)      | 79,57   |
| 2      | -1 (50)                 | 1 (3/10)       | 63,39   |
| 3      | 1 (100)                 | -1 (1/10)      | 68,34   |
| 4      | 1 (100)                 | 1 (3/10)       | 66,30   |
| 5      | -1,41 (40)              | 0 (2/10)       | 69,50   |
| 6      | +1,41 (110)             | 0 (2/10)       | 67,39   |
| 7      | 0 (75)                  | -1,41 (0,6/10) | 81,66   |
| 8      | 0 (75)                  | +1,41 (3,4/10) | 56,68   |
| 9      | 0 (75)                  | 0 (2/10)       | 66,48   |
| 10     | 0 (75)                  | 0 (2/10)       | 67,50   |
| 11     | 0 (75)                  | 0 (2/10)       | 66,41   |

X<sub>1</sub> = agitação (rpm); e X<sub>2</sub> = relação massa de amostra/volume de solvente (g/mL). Variáveis independentes fixas: solvente etanol (90% acidificado com 0,01% de HCl), tempo de extração (2h), temperatura (4°C).

A Figura 16 apresenta o gráfico de Pareto, com as variáveis estimadas do planejamento fatorial completo  $2^2$  em função do teor de AT, onde verifica-se que a relação massa de amostra/volume de solvente exerce efeito negativo significativo, ou seja, quanto menor a massa da amostra no solvente maior será a extração de AT. Isto deve-se à maior quantidade de solvente disponível para a extração, que promove uma maior transferência de massa de antocianinas da matriz vegetal para o solvente. Entretanto, observa-se pequena diferença no teor de AT obtido entre os ensaios 1 e 7, porém a quantidade de massa de amostra é 40% maior no ensaio 1. Por esta razão, a relação massa de amostra/volume de solvente definida para os próximos experimentos foi de 1 g/10mL.

A agitação também exerce efeito negativo, porém não significativo ao nível de 5%. Portanto, levando isto em consideração e também os custos de processo que seriam aumentados com o emprego de agitação, definiu-se que os experimentos seguintes seriam realizados de modo estático (sem agitação).

Figura 16 – Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis agitação e relação massa de amostra/volume de solvente testadas no planejamento fatorial completo  $2^2$  para a extração de AT\* da casca do araçá-vermelho.



\* Teor de antocianinas totais (AT) em Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca.

### 5.5.2 Efeito do pH e temperatura

A Tabela 11 demonstra a matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  em relação às variáveis independentes pH e temperatura, e a respectiva resposta em termos de teor de AT da casca do araçá-vermelho. Os maiores teores de AT foram de 115,22 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca empregando pH 1 e temperatura de 65 °C (ensaio 2) e de 114,47 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca empregando pH 1,5 e temperatura de 40 °C (ensaio 9), respectivamente. Este teor é superior aos encontrados por Teixeira et al. (2008) para a casca da berinjela ( $64,06 \pm 8,44$ ), repolho roxo ( $61,44 \pm 3,71$ ) e romã ( $12,67 \pm 1,25$ ), e para Patil et al. (2009) que extraiu 37,26 mg/100g da casca do rabanete, o que demonstra que a casca do araçá é uma boa fonte de antocianinas.

Tabela 11 – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  (valores reais e codificados) das variáveis pH e temperatura e respostas em teor de antocianinas totais dos ensaios em extração com etanol 90%.

| Ensaio | Variáveis independentes |                | Teor de antocianinas totais<br>(Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca) |
|--------|-------------------------|----------------|---|
|        | X <sub>1</sub>          | X <sub>2</sub> |   |
| 1      | -1 (1)                  | -1 (15)        | 89,84   |
| 2      | -1 (1)                  | 1 (65)         | 115,22  |
| 3      | 1 (2)                   | -1 (15)        | 54,27   |
| 4      | 1 (2)                   | 1 (65)         | 69,39   |
| 5      | -1,41 (0,8)             | 0 (40)         | 95,03   |
| 6      | +1,41 (2,21)            | 0 (40)         | 60,99   |
| 7      | 0 (1,5)                 | -1,41 (4,8)    | 79,39   |
| 8      | 0 (1,5)                 | +1,41 (75,2)   | 88,27   |
| 9      | 0 (1,5)                 | 0 (40)         | 114,47  |
| 10     | 0 (1,5)                 | 0 (40)         | 112,74  |
| 11     | 0 (1,5)                 | 0 (40)         | 111,98  |

X<sub>1</sub> = pH; e X<sub>2</sub> = Temperatura (°C). Variáveis independentes fixas: solvente etanol (90%), relação massa de amostra/volume de solvente (1g/10mL) e tempo de extração (2h).

As respostas apresentadas na Tabela 11 foram tratadas estatisticamente. Os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(5) para o teor de antocianinas totais, à nível de confiança de 95%, estão no Apêndice II deste documento. O pH e a temperatura influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) sobre o teor de AT, sendo que o pH exerce efeito negativo e a temperatura efeito positivo, ou seja, quanto menor o pH e maior a temperatura, maior será o teor de AT extraído.

A Equação 4 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve o teor de AT em função das variáveis independentes (pH e temperatura). O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela II – Apêndice II), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,95 e  $F_{\text{calc}}$  4,4 vezes maior que o valor do  $F_{\text{tab}}$ , permitindo assim a construção da superfície de resposta e a curva de contorno, apresentadas na Figura 17.

$$AT = 113,06 - 6,6X_1 - 5,88X_1^2 + 2,7X_2 - 4,88X_2^2 \quad (4)$$

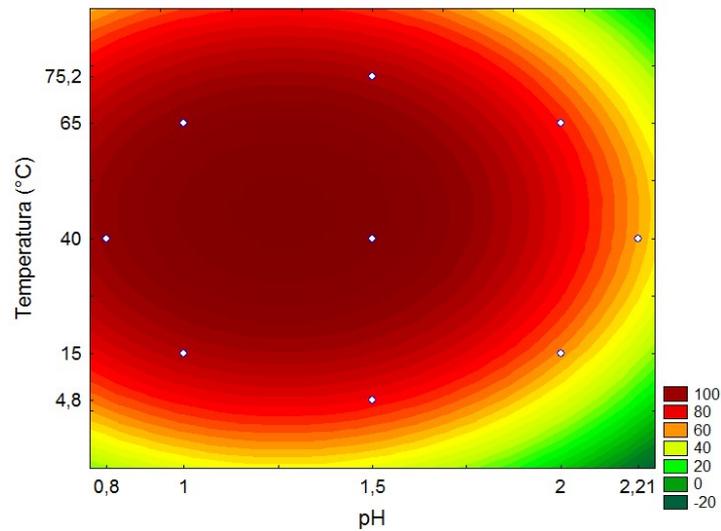
Onde:

AT = teor de antocianinas totais (Eq. Mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca)

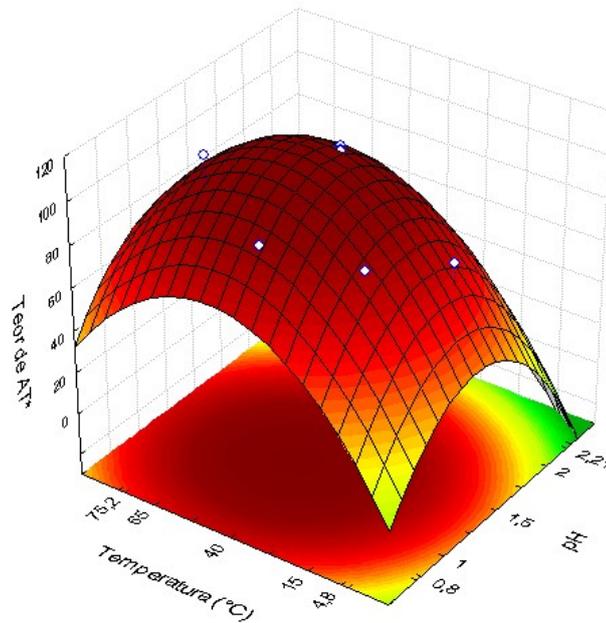
$X_1$  = pH

$X_2$  = Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )

Figura 17 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) em função do pH e da temperatura para a extração de antocianinas totais da casca do araçá-vermelho.



(a)



(b)

\* Teor de AT expresso em Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca. Condições fixas: tempo de extração (2 h), relação massa de amostra/volume de solvente (1 g/10mL) e concentração de etanol 90%.

Conforme observado na Figura 17, os maiores teores de AT são obtidos na faixa de pH entre 1,0 e 1,5 e temperatura entre 40 e 65 °C. Bordignon Jr. et al. (2009) também encontrou os maiores teores de antocianinas totais em pHs próximos a 1 na extração de antocianinas do morango.

As variáveis do ponto central, temperatura de 40 °C e pH 1,5 são mais eficientes à nível experimental, pois para a temperatura de 65 °C é necessário um maior consumo de energia e o pH 1,0 limita as aplicações do extrato como corante em alimentos.

Por isso, a temperatura de 40 °C e o pH de 1,5 foram definidos para a etapa seguinte, a qual visa avaliar a extração assistida por ultrassom. Tempo de 2 h, relação massa de amostra/volume de solvente de 1g/10mL e etanol em concentração 90% são os parâmetros que complementam esta condição.

## **5.6 Extração assistida por ultrassom**

A metodologia assistida por ultrassom foi empregada para avaliar se esta apresentaria uma maior eficiência em comparação à metodologia convencional. Para tanto, os parâmetros otimizados na extração de antocianinas através da metodologia convencional por maceração foram fixados (2 h, 4 °C, 1g de amostra/10mL de etanol 90%), aliados à frequência do equipamento em 50 KHz e à potência de 99W. Após a realização dos experimentos de extração nestas condições, obteve-se 108,04 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca de araçá-vermelho. Este teor é inferior ao encontrado na condição otimizada do método convencional.

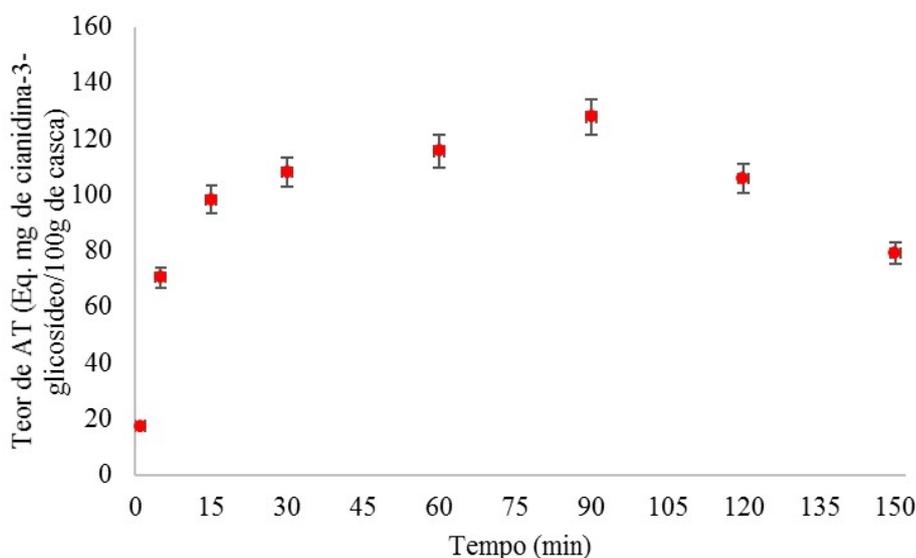
### *5.6.1 Cinética da extração assistida por ultrassom*

Para conhecer o comportamento do teor de AT, realizou-se uma cinética de extração na metodologia assistida por ultrassom por 150 minutos, conforme a Figura 18.

O maior teor de AT foi de 125,88 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca aos 90 minutos. Entretanto, após este tempo, o teor de antocianinas diminuiu, sugerindo que ocorre degradação do composto em tempos de processo maiores que 90 minutos.

Das et al. (2016), ao avaliar a extração de AT do arroz preto através da metodologia assistida por ultrassom utilizando a mesma frequência (50KHz) e temperaturas próximas a 40 °C, também concluiu que esta metodologia provoca um processo de degradação a partir de certo tempo, com geração de radicais livres e despolimerização do composto.

Figura 18 – Cinética da extração de AT de casca de araçá-vermelho através da metodologia assistida por ultrassom (US).



Condições fixas: relação massa de amostra/volume de solvente (1g/10mL), temperatura (40°C), pH (1,5), etanol (90%) e frequência (50KHz).

## 5.7 Comparação dos resultados obtidos a partir das extrações convencional e assistida por ultrassom

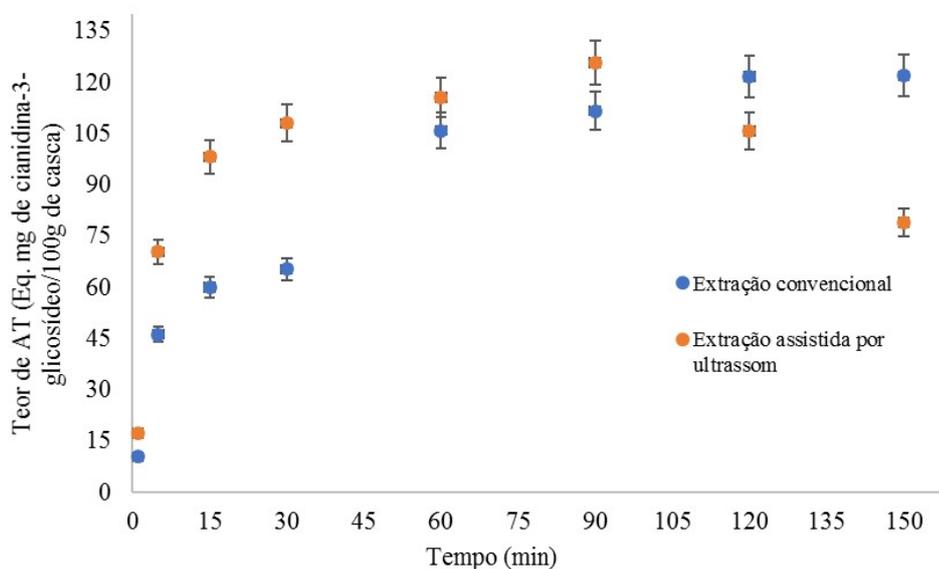
### 5.7.1 Tempo de extração

A Figura 19 apresenta a comparação das cinéticas de extração empregando as metodologias convencional e assistida por ultrassom e o desvio padrão da triplicata de cada tempo.

A extração convencional apresentou o tempo de 120 min como o necessário para se atingir o teor máximo de AT (121,81 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca). Para a metodologia de extração assistida por ultrassom, o teor máximo de AT foi de 125,88 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca, obtido aos 90 min.

Comparando os dois métodos no tempo de 90 min a partir da análise de variância (ANOVA), observa-se que a metodologia convencional apresentou teor de 116,81 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca, inferior e significativamente diferente ( $p > 0,05$ ) à metodologia assistida por ultrassom no mesmo tempo. A mesma comparação, realizada aos 120 min, mostra que a extração convencional apresenta maior teor de AT (121,85 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca), enquanto que a extração assistida por ultrassom resulta em um teor de 105,89 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca.

Figura 19 – Comparação das cinéticas de extração através das metodologias convencional e assistida por ultrassom.



Condições de extração: concentração de etanol (90%), relação massa de amostra/solvente (1g/10mL), temperatura (40°C), frequência (somente para ultrassom – 50KHz).

Adjé et al. (2010) verificou que o ultrassom tornou a extração três vezes mais rápida do que a metodologia convencional por maceração para as antocianinas de flores *Delonix regia*, mas também não houve aumento significativo do teor máximo de AT extraído em comparação ao método convencional (mas com maior tempo de processo). Chen et al (2007) também concluiu que a utilização de ultrassom diminui o tempo de extração de antocianinas de framboesas, quando comparado com a extração convencional.

A partir dos resultados obtidos através das cinéticas de extração das duas metodologias, é possível observar que a extração assistida por ultrassom é mais eficiente que a extração convencional, pois apresenta o mesmo teor de AT ( $p < 0,05$ ) para um tempo 30 minutos inferior ao convencional. Entretanto, a diferença significativa entre as metodologias fica próxima a 6%. Então, é necessário verificar o custo operacional do processo de extração assistida por ultrassom, visto que o equipamento é de alto valor, podendo não ser vantajoso frente à extração convencional. Ressalta-se também que a metodologia assistida por ultrassom promove degradação das AT após 90 min de extração, fato que não é observado na extração convencional em nenhum ponto da avaliação (0-150min). A partir desta informação, estudos futuros podem ser realizados para verificar a estabilidade das AT após as extrações através dos dois métodos analisados.

### 5.7.2 Compostos bioativos

A Tabela 12 exibe os resultados referentes aos teores de AT, fenólicos totais, flavonoides, carotenóides e a atividade antioxidante para os extratos obtidos a partir dos métodos de extração convencional e assistido por ultrassom da casca do araçá-vermelho. As extrações foram realizadas com etanol 90%, pH 1,5, temperatura de 40 °C e relação massa de amostra/volume de solvente de 1 g/10mL, frequência de 50 KHz (apenas para o método assistido por ultrassom) e o tempo de extração foi de 120 e 90 min para as metodologias convencional e assistida por ultrassom, respectivamente.

O teor máximo da extração de AT nestas condições experimentais não foi significativamente diferente para as duas metodologias. Entretanto, são teores superiores a 100 Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100 de casca, elevados para antocianinas, o que pode caracterizar a casca do araçá-vermelho como uma boa fonte deste composto. Fetter et al. (2010) obteve 36,12 mg de antocianinas utilizando o fruto inteiro, aproximadamente 4 vezes menos do que a análise deste trabalho somente na casca, o que sugere que a casca é o local onde estão distribuídas as antocianinas do araçá-vermelho.

Tabela 12 – Comparativo do teor de antocianinas totais entre o método convencional de extração por maceração e assistida por ultrassom.

| Compostos Bioativos  | Método de extração         |                            |
|--|----------------------------|----------------------------|
|  | Convencional               | Ultrassom                  |
| Antocianinas<br>(Eq. mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca) | 116,81 <sup>a</sup> ± 1,12 | 121,85 <sup>a</sup> ± 0,91 |
| Fenólicos Totais<br>(Eq.mg de ácido gálico/100g de casca)        | 477,53 <sup>a</sup> ± 3,09 | 589,49 <sup>b</sup> ± 2,15 |
| Flavonoides<br>(mg de catequina/100g de casca)                   | 351,80 <sup>a</sup> ± 2,25 | 374,05 <sup>b</sup> ± 1,33 |
| Carotenóides<br>(µg de β-caroteno/mL de extrato)                 | 4,45 <sup>a</sup> ± 0,02   | 4,47 <sup>a</sup> ± 0,04   |
| Atividade antioxidante<br>(% inibição DPPH)                      | 85,57 <sup>a</sup> ± 0,16  | 86,31 <sup>a</sup> ± 0,25  |

Condições de extração: concentração de etanol (90%) em pH 1,5, relação massa de amostra/solvente (1g/10mL), temperatura (40°C), tempo (120 min extração convencional e 90 min extração assistida por ultrassom), frequência (somente para ultrassom – 50KHz).

O teor de compostos fenólicos totais da extração convencional foi de 477,53 Eq. mg de ácido gálico/100g de casca, enquanto que na extração assistida por US o teor chegou a

589,49 mg. Denardin et al. (2015), McCook-Russel (2012) e Medina et al. (2011) também encontraram valores superiores à 450 mg em seus estudos com o fruto inteiro do araçá-vermelho através da extração convencional. O presente estudo corrobora os resultados obtidos pelos demais autores, confirmando que o fruto é rico em compostos fenólicos e pode ser utilizado para a prevenção de doenças.

O teor de flavonoides encontrados para as extrações convencional e assistida por ultrassom foi de 351,80 e 374,05 mg de catequina/100g de casca, respectivamente. Biegelmeyer et al. (2011) e Cunha (2014) obtiveram valores próximos a 100 mg de catequina/100g de fruto inteiro utilizando a metodologia convencional de extração. Tais resultados demonstram que a casca concentra maior teor de flavonoides em relação ao fruto inteiro.

Na comparação entre os compostos fenólicos totais e flavonoides obtidos através dos dois métodos, nota-se que a extração assistida por ultrassom é mais eficiente, sendo 23,45% maior do que o encontrado na metodologia convencional para fenólicos totais e 12% para flavonoides. Isso pode ser explicado através do processo de cavitação provocado pela US, que leva à ruptura da parede celular e liberação de compostos ricos em polifenóis através da transferência de massa (ABID et al., 2013).

Com relação ao teor de carotenoides, não houve diferença significativa ao nível de 5% entre as amostras submetidas aos dois métodos de extração. O teor médio obtido ficou entre 4,45 e 4,47  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno/mL de extrato. Os valores são superiores aos achados de Fetter et al. (2010) com 1,07  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno/mL de extrato, e semelhantes aos encontrados por Denardin (2015) e Medina et al. (2011). A diferença de valores se dá em virtude do clima do local de cultivo e do grau de maturação, que pode influenciar na composição química dos frutos. Em comparação com o araçá-amarelo estudado por Pereira et al. (2012), a casca do araçá-vermelho apresenta maior teor de carotenoides, pois os resultados obtidos por este autor foram de 2,95  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno/mL de extrato.

A eficiência da atividade antioxidante, avaliada em função do percentual de inibição de DPPH dos dois extratos, apresentou 85,57% e 86,31% de inibição para as metodologias convencional e assistida por ultrassom, respectivamente, utilizando extrato na concentração de 50mg/mL. Esta eficiência pode ser correlacionada com o alto teor de AT da casca do araçá-vermelho, pois estas de uma forma geral são mais reativas do que os demais compostos fenólicos, devido basicamente à sua forma de cátion, que pode ser facilmente oxidada e reativa. Mais investigações são necessárias em situações *in vivo* para comprovar esta superioridade da eficiência das antocianinas frente a outros compostos fenólicos.

## 6 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho, de acordo com os objetivos propostos, estão listadas abaixo:

1. A casca do araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) foi caracterizada, fornecendo subsídios sobre esta parte do fruto que não foram encontrados na literatura;
2. As AT são degradadas quando a matriz vegetal é submetida à processo de secagem em estufa de circulação de ar, mesmo em temperaturas próximas à 38 °C. A combinação entre a temperatura e a presença de oxigênio pode ter ocasionado a degradação. A partir deste resultado, as amostras foram apenas descongeladas para as análises seguintes;
3. O solvente etanol não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com o metanol quanto à extração de AT da casca do araçá-vermelho. Assim sendo, o etanol foi escolhido como solvente de trabalho;
4. A concentração de etanol ideal encontrada para a extração de AT da casca do araçá-vermelho foi de 90%, pois não apresentou diferença significativa à nível de 5% com o etanol puro, que foi ligeiramente mais eficaz;
5. A cinética de extração para a metodologia convencional apresentou o tempo de 120 minutos como o momento em que a extração de AT é estabilizada;
6. O delineamento experimental foi realizado através de dois planejamentos fatoriais completos  $2^2$ , onde demonstrou que as variáveis independentes relação da massa de amostra/volume de solvente e pH exercem efeito significativo negativo, ou seja, é necessário um pH baixo (entre 1 e 1,5) e relação massa de amostra/volume de solvente (entre 0,6 e 1 g/10mL) para o maior teor de AT. A temperatura também exerce efeito significativo, porém positivo, apresentando a melhor faixa entre 40 e 65°C. A partir da análise dos dados obtidos e da literatura, ficou estabelecido que o pH 1,5, a relação massa de amostra/volume de solvente de 1 g/10mL e a temperatura de 40°C são as variáveis otimizadas para a extração de AT da casca do araçá-vermelho;
7. A extração assistida por ultrassom foi realizada a partir das condições otimizadas da extração via metodologia convencional. Após a realização da cinética, o tempo ideal de extração obtido foi de 90 min, 30 min inferior ao tempo necessário para a extração através da metodologia convencional. A partir dos 90 min, a extração assistida por ultrassom começa a degradar as AT, não sendo ideal manter o processo além deste tempo;

8. A casca do araçá-vermelho é rica em todos os compostos bioativos estudados. Vários autores também concluíram que o fruto do araçá-vermelho contém altos teores de compostos bioativos, portanto é possível afirmar que a sua ingestão pode trazer benefícios à saúde;
9. A extração assistida por ultrassom apresentou maior eficiência comparada à metodologia convencional apenas para compostos fenólicos totais e flavonoides. Para antocianinas totais, carotenóides e atividade antioxidante, não há diferença significativa entre os dois métodos;
10. É necessário avaliar os custos da extração promovida pelos dois métodos, para verificar se a diferença de tempo justifica e compensa a utilização do ultrassom.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a estabilidade dos extratos obtidos pelos métodos convencional e assistido por ultrassom;
- Otimizar a extração de AT da casca do araçá-vermelho através da metodologia assistida por ultrassom;
- Avaliar a concentração mínima de extrato para atividade antioxidante ( $IC_{50}$ )
- Realizar extração de AT da casca de araçá-vermelho utilizando alta pressão, através de líquido pressurizado (PLE) e fluido supercrítico (SFE);
- Encapsular os extratos, visando melhor estabilidade e conservação dos compostos;
- Caracterizar os compostos bioativos da casca do araçá através de cromatografia;
- Avaliar os compostos bioativos das demais partes do fruto, principalmente a semente onde também não foram encontrados estudos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABID, M.; JABBAR, S.; WU, T.; HASHIM, M.M.; HU, B.; LEI, S.; ZHANG, X.; ZENG, X. Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1182-1187, 2013.
- ADJÉ, F.; LOZANO, Y.F.; LOZANO, P.; ADIMA, A.; CHEMAT, F.; GAYDOU, E.M. Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 439-444, 2010.
- ALVARENGA, F.Q.; MOTA, B.C.F.; ROYO, V.D.A.; LAURENTIZ, R.D.S.D.; MENEZES, E.V. In vitro antimicrobial activity of leaves of araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) against oral micro-organisms. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 45, n. 3, p. 149-153, 2016.
- ANDRADE, J.M.; APEL, M.A.; RASEIRA, M.C.B.; PEREIRA, J.F.M.; HENRIQUES, A.T. **Avaliação do conteúdo de ácidos graxos no óleo das sementes de espécies nativas de Myrtaceae no Rio Grande do Sul**. 31ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química. 2008.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.
- ANGERAMI, L.A.T.; VIEIRA, T.C.; STREFEZZI, R.D. Exposição de educadores físicos aos efeitos dos trihalometanos presentes em piscina de recreação clorada e o controle dos radicais livres através dos antioxidantes. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 1, n. 3, 2012.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos – Teoria e Prática**. Viçosa: UFV, 6ª ed. 2015. 668p.
- ASAMI, D.K.; HONG, Y.J.; BARRETT, D.M.; MITCHELL, A.E. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1237-1241, 2003.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.D.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4. p. 629-643, 2010.
- BARROS, F.A.R.; STRINGHETA, P.C. Microencapsulamento de antocianinas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 9, n. 36, 2006.
- BASTOS, D.H.M.; ROGERO, M.M.; ARÊAS, J.A.G. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BIEGELMEYER, R.; ANDRADE, J.M.M.; ABOY, A.L.; APEL, M.A.; DRESCH, R.R.; MARIN, R.; RASEIRA, M.C.B.; HENRIQUES, A.T. Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum*) and Yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) Strawberry Guava Fruit. **Food Science**, v. 76, n. 7, p. C991-C996, 2011.

BLAINSKI, A.; LOPES, G.C.; DE MELLO, J.C.P. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6852-6865, 2013.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química de processamento de alimentos**. Varela: São Paulo, 3ª ed., 2001.

BORDIGNON JR, C.L.; FRANCESCATTO, V.; NIENOW, A.A.; CALVETE, E.; REGINATTO, F.H. Influence of the extraction solution pH on the content of anthocyanins in strawberry fruits. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 29, n. 1, p. 183-188, 2009.

BRACK, P.; KINUPP, V.F.; SOBRAL, M.E.G. Levantamento preliminar de espécies frutíferas de árvores e arbustos nativos com uso atual ou potencial do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 1, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL, ANVISA. **Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional**. Diário Oficial da União, Brasília, 2003.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutritional Review**, v. 56, n.11, p. 317-33, 1998.

BUENO, J.M.; SÁEZ-PLAZA, P.; RAMOS-ESCUADERO, F.; JIMÉNEZ, A.M.; FETT, R.; ASUERO, A.G. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 126-151, 2012.

CARRATU, E.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. **Ann. Ist. Super Sanità**, v. 41, n.1, p.7-16, 2005.

CARRERA, C.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 100–104, 2012.

CAVALHEIRO, C.V. **Extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom e determinação de ácidos graxos e minerais em folhas de *Olea europaea* L.** Santa Maria – RS. (Dissertação de Mestrado). UFSM, 2013.

CAVALCANTI, A.L.; OLIVEIRA, K.F.D.; PAIVA, P.S.; DIAS, M.V.R.; COSTA, S.K.P.D.; VIEIRA, F.F. Determinação dos sólidos solúveis totais (°Brix) e pH em bebidas lácteas e

sucos de frutas industrializados. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**. 2006. p. 57-64.

CHAVES, V.C. **Teor de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade de captação de radicais livres de frutos de cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch)**. 2014. 104p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – UFSC, Florianópolis. 2014.

CHEMAT, F.; KHAN, M.K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 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, n. 6, p. 767-778, 2007.

CONSTANT, P.B.L. **Extração, caracterização e aplicação de antocianinas de açaí (*Euterpe oleraea*, M.)**. 2003. 112 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – UFV, Viçosa. 2003.

CORRÊA, L.C. **Similaridade genética em acessos de goiabeiras e araçazeiros: análises químicas e bioquímicas dos frutos**. 2009. 96 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. 2009.

COUTINHO, M.A.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.3, p. 241-256. 2009.

CUNHA, D.C. da. **Avaliação de fitoquímicos e das atividades antioxidante celular e antiproliferativa do suco de araçá-una (*Psidium eugeniaefolia*) e araçá-morango (*Psidium cattleianum*)**. 2014. 104 p. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) – UNIFAL, Alfenas. 2014.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DALLA NORA, C. **Caracterização, atividade antioxidante “in vivo” e efeito do processamento na estabilidade de compostos bioativos do araçá-vermelho e guabiju**. 2012. 91 p. Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – UFRGS, Porto Alegre. 2012.

DALLA NORA, C.; MÜLLER, C.D.R.; DE BONA, G.S.; DE OLIVEIRA RIOS, A.; HERTZ, P.F.; JABLONSKI, A.; JONG, E.V.; FLÔRES, S.H. Effect of processing on the stability of bioactive compounds from red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiju (*Myrcianthes pungens*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34, n. 1, p. 18–25, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DAS, A.B.; GOUD, V.V.; DAS, C. Extraction of phenolic compounds and anthocyanin from black and purple rice bran (*Oryza sativa* L.) using ultrasound: A comparative analysis and phytochemical profiling. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 332-341, 2017.

DAVIES, B.H. Carotenoid. In: Goodwin, T. W. (ed.), *Chemistry and Biochemistry of Plants and Pigments*, p. 138-165, **Academic Press**, New York, 1976.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J.P.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818-1892, 2013.

DENARDIN, C.C.; HIRSCH, G.E.; DA ROCHA, R.F.; VIZZOTTO, M.; HENRIQUES, A.T.; MOREIRA, J.C.; GUMA, F.T.C.R.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387-398, 2015.

DIDACFORNER. **Antocianinas, um pHmetro de maceta**. Disponível em: <http://didacforner.net/antocianinas-un-phmetro-de-maceta/#more-1514>. Acesso em 30/12/2016.

DOMINGUINI, L.; BORGES, J.M.; DOS SANTOS, M.D.; LEANDRO, F.P.; DE SOUSA TOLEDO, A.L.; FIGUEIREDO, A.P. Estudo da estabilidade de antocianinas em diferentes alcoóis alifáticos para uso como indicador de pH. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 16, n. 1, p. 129-142, 2014.

DREHMER, A.M.F.; AMARANTE, C.V.T. Post harvest preservation of red strawberry-guavas as affected by maturity stage and storage temperature. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 322–326, 2008.

EINBOND, L.S.; REYNERTSON, K.A.; LUO, X.D.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**. v. 84, p. 23, 2004.

FALLER, A.L.K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 211-218, 2009.

FANG, J. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. **Nutrition**. v. 31. p. 1301-1306, 2015.

FAVARO, M.M.A. **Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes**. 2008. 100 p. Dissertação (Mestrado em Química) – UNICAMP, 2008.

FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods Word**, v. 45. n. 5, p. 208-213, 2000.

FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. **Anthocyanins as food colors**, p. 181-207, 1982.

FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in lipid research**, v. 43, n. 3, p. 228-65, 2004.

FRANZON, R.C.; CAMPOS, L.D.O.; PROENÇA, C.E.B.; SOUSA-SILVA, J.C. **Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e uso**. Planaltina. DF: EMBRAPA Cerrados, 2009. 48 p.

GEORGE, V.C.; DELLAIRE, G.; RUPASINGHE, H.P.V. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v.45, p. 1-14, 2016.

GLOVER, B.J.; MARTIN, C. Anthocyanins. **Current Biology**, v. 22, n. 5, p. R147-R150, 2012.

GOEDERT, C.O. História e avanços em recursos genéticos no Brasil. **Recursos energéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. P. 23-60.

GÓMEZ-PLAZA, E.; MIÑANO, A.; LÓPEZ-ROCA, J.M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 87-94, 2006.

GONDIM, J.A.M.; MOURA, M.D.F.; DANTAS, A.S.; MEDEIROS, R.L.S.; SANTOS, K.M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HORST, M.A.; LAJOLO, F.M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2007. v. 1. p. 697-731.

HOUGHTON, J.D. (Eds.) **Natural Food Colorants**. 2nd ed. Londres: Chapman & Hall, 1996. p. 245- 309.

IBRAF. INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br>. Acesso em: 30/12/2016.

IM, I.; PARK, K.R.; KIM, S.M.; KIM, C.; PARK, J.H.; NAM, D.; JANG, H.J.; SHIM, B.S.; AHN, K.S.; MOSADDIK, A.; SETHI, G.; CHO, S.K. The butanol fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract suppresses MMP-2 and MMP-9 expression and activity through the suppression of the ERK1/2 MAPK signaling pathway. **Nutrition and Cancer**, v. 64, p. 255–266, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. 1. ed. digital. São Paulo, 2008. 1020p.

JACQUES, A.C.; PERTUZATTI, P.B.; BARCIA, M.T.; ZAMBIAZI, R.C.; CHIM, J.F. Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1720-1725, 2010.

JACKMAN, R.L.; SMITH, J.L. Anthocyanins and betalains. **Natural food colorants**. Springer US, 1996. p. 244-309.

JU, Z.Y.; HOWARD, L.R. Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5207-5213, 2003.

KINUPP, V.F.; BARROS, I.B.I. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 846-857, 2008.

KOBORI, C.N. **Composição e estabilidade de carotenóides em alimentos**. 2010. 217 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – UNICAMP, Campinas. 2010.

KOTOVICZ, V. **Extração rápida de compostos solúveis de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) por ciclos de compressão e descompressão hidrostática: experimentos, modelagem e simulação**. 2014. 115 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – UFPR, Curitiba. 2014.

LIMA, F.O. **Estudo comparativo da bioatividade de compostos fenólicos em plantas medicinais**. 2013. 145 p. Tese (Doutorado em Química) – USFM, Santa Maria. 2013.

LIU, R.H. Potencial synergy of phytochemicals in câncer prevention: mechanism of action. **The American Society for Nutritional Sciences**, v. 134, p. 3479S-3485S, 2004.

LOPES, T.; XAVIER, M.; QUADRI, M.G.; QUADRI, M. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.3, p. 291-297, 2007.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do CEPPA**, v. 24, p. 59-82, 2006.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 05, p. 727-747, 2004.

MANICA, I. **Frutas nativas, silvestres e exóticas: Técnicas de produção e mercado--abiu, amora-preta, araçá, bacuri biribá, carambola, cereja-do-reo-grande, jaboticaba**. Cinco Continentes Editora, 2000.

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

MARQUES, A.; CHICAYBAM, G.; ARAUJO, M.T.; MANHÃES, L.R.T.; SABAA-SRUR, A.U. Composição centesimal e de minerais de casca e polpa de manga (*Mangifera indica* L.) CV. Tommy Atkins. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1206-1210, 2010.

MATIAS, I.; BUOSI, A.; GOMES, F.C.A. Functions of flavonoids in the central nervous system: Astrocytes as targets for natural compounds. **Neurochemistry International**. v.95, p. 85-91, 2016.

MATTOS, J.R. **Frutos indígenas comestíveis do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1978. 31 p.

MCCOOK-RUSSELL, K.P.; NAIR, M.G.; FACEY, P.C.; BOWEN-FORBES, C.S. Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits. **Food Chemistry**. v.134, p. 1069-1073, 2012.

MEDINA, A.L.; HAAS, L.I.R.; CHAVES, F.C.; SALVADOR, M.; ZAMBIAZI, R.C.; DA SILVA, W.P.; NORA, L.; ROMBALDI, C.V. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 916–922, 2011.

MONEGO, D.L.; DA ROSA, M.B.; NASCIMENTO, P.C. Applications of computational chemistry to the study of the antiradical activity of carotenoids: A review. **Food Chemistry**, v. 217, p. 37-44, 2017.

MONTES, C.; VICARIO, I.M.; RAYMUNDO, M.; FETT, R.; HEREDIA, F.J. Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia Jaboticaba* Berg.). **Food Research International**, v. 38, n. 8, p. 983-988, 2005.

NOVELLO, Z. **Extração e caracterização química de extratos obtidos de matrizes vegetais utilizando n-butano pressurizado como solvente**. 2015. 75 p. Tese de doutorado (Engenharia de Alimentos) – URI, Erechim. 2015.

PAN, Z.; QU, W.; MA, H.; ATUNGULU, G.G., MCHUGH, T.H. Continuous And pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 1249–1257, 2011.

PATEL, S. Exotic tropical plant *Psidium cattleianum*: a review on prospects and threats. **Rev Environ Science Biotechnology**. v. 11, p. 243–248, 2012.

PATIL, G.; MADHUSUDHAN, M.C.; BABU, B.R.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 1, p. 364-369, 2009.

PATIST, A; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. **Innov Food Sci Emerg Technol**. v. 9, p. 147-54, 2008.

PEREIRA, M.C.; STEFFENS, R.S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P.F.; DE O. RIOS, A.; VIZZOTTO, M.; FLÔRES, S.H. Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the *Myrtaceae* family. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3061-3067, 2012.

RASEIRA, M.C.B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro (*Psidium cattleianum*)**. Pelotas: EMBRAPA/CPACT, 1996. 95p.

REISSIG, G.N. **Geleias convencionais e diet de araçá e de pitanga: estabilidade no processamento e armazenamento**. 2015. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – UFPEL, Pelotas. 2015.

RODRIGUES DA SILVA, L.; MARTINS, L.D.V.; BANTIM FELICIO CALOU, I.; MEIRELES DE DEUS, M.D.S.; FERREIRA, P.M.P.; PERON, A.P. Flavonóides:

constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, v. 23, n. 1, 2015.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3ªed. Casa do Pão Editora, 2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008. 100p.

RIBEIRO, A.H.R. **Bioprodução de carotenóides por uma nova cepa de *Sporidiobolus pararoseus* utilizando resíduos agroindustriais**. 2011. 56 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – URI, Erechim. 2011.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de alimentos**. 2ªed. São Paulo: Editora Blucher, 2007. 184p.

SAMPAIO, P.G. **Otimização da extração, esterilização e identificação de antocianinas obtidas a partir de frutas**. 2008. 141 p. Dissertação (Mestrado em Química). UNICAMP, Campinas. 2008.

SANCHOTENE, M.C.C. **Frutíferas nativas úteis e fauna na arborização urbana**. 2. ed. Porto Alegre: Sagra. 1989. 304 p.

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.

SELEEM, D.; PARDI, V.; MURATA, R.M. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 76. p. 76-83. 2016.

SEIGLER, D.S. Plant Secondary Metabolism. **Kluwer Academic Publisher: Netherlands**. p. 3. 1995.

SANTOS, M.S.; PETKOWICZ, C.L.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; CARNEIRO, E.B.B. Propriedades reológicas de doce em massa de araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) rheological properties of jams in mass of red strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine). **Revista Brasileira de Tecnologia**, v. 1, n. 02, p. 104-116, 2007.

SILVA, M.C. **Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos**. 2004. 137 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – UNICAMP, Campinas. 2004.

SILVA, M.R; LACERDA, D.B.C.L.; SANTOS, G.G.; MARTINS, D.M.O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1790-1793, 2008.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; DOS SANTOS SANTANA, A.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, T.P. Composição de compostos fenólicos e carotenoides do araçá-vermelho (*Psidium longipetiolatum*) por HPLC-DAD-MS. UFRGS, 2015.

SILVA JÚNIOR, M.C. **100 árvores do cerrado: guia de campo**. Brasília, DF: Rede de sementes do cerrado. 2005. 278 p.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu Reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SWAIN, T. HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I – The quantitative analysis of phenolics constituents. **Journal of the Science Food and Agriculture**. Oxford, v. 10, p-63-68, 1959.

TEIXEIRA, L.N.; STRINGHETA, P.C.; DE OLIVEIRA, F.A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Ceres**, v. 55, n. 4, 2015.

TERCI, D.B.L. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas**. 2014. 99 p. Tese (Doutorado em Química) – UNICAMP, Campinas. 2004.

TERCI, D.B.L.; ROSSI, A.V. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução? **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 684, 2002.

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M.; FURIGO, A. J. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Quim Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-36, 2009.

VALLS, J.; MILLÁN, S.; MARTÍ, M.P.; BORRÀS, E.; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 43, p. 7143-72, 2009.

VANIN, C. da R. **Araçá-amarelo: atividade antioxidante, composição nutricional e aplicação em barra de cereais**. 2015. 117 p. Dissertação de Mestrado (Tecnologia em Alimentos) – UTFPR, Curitiba. 2015.

VARDANEGA, R.; SANTOS, D.T.; MEIRELES, M.A. Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. **Pharmacognosy reviews**. v. 8, n. 16, p. 88-95, 2014.

VENDRUSCOLO, G.S.; MENTS. L.A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Série Botânica**, v. 61, p. 83–103, 2006.

VIEIRA, G.S. **Estudo dos processos de extração de Antocianinas da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) E da concentração do extrato por nanofiltração**. 2015. 249 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). UNICAMP, Campinas. 2015.

WANG, L.; WELLER, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 300-312, 2006.

WILLE, G.M.F.C.; MACEDO, R.E.F.; MASSON, M.L.; STERTZ, S.C.; CELUPPI NETO, R.; LIMA, J.M. Desenvolvimento de tecnologia para a fabricação de doce em massa com araçá-pêra (*Psidium acutangulum* d. c.) para o pequeno produtor. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1360-1366, 2004.

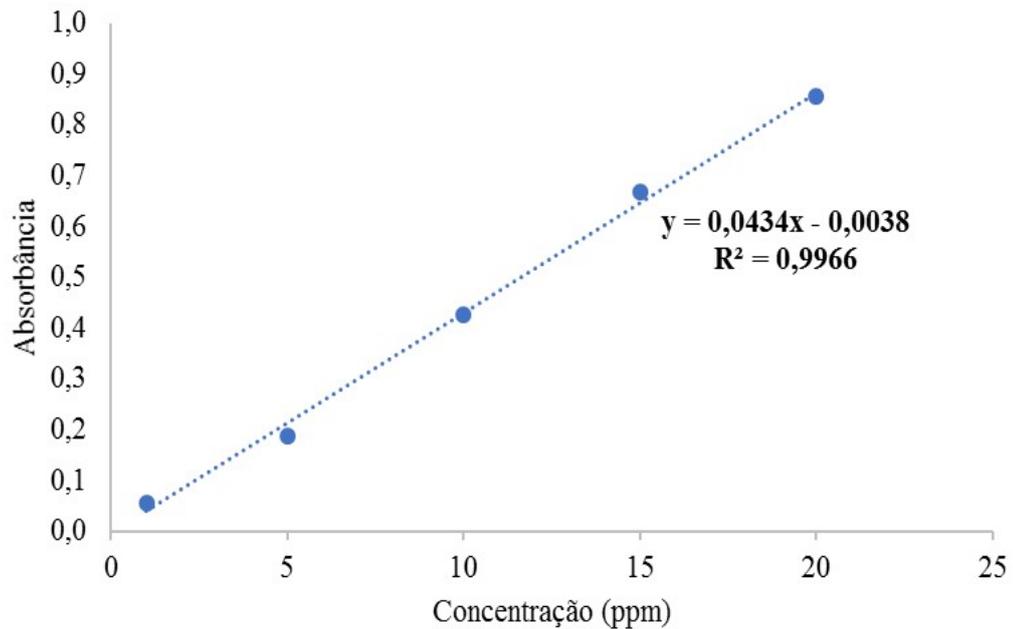
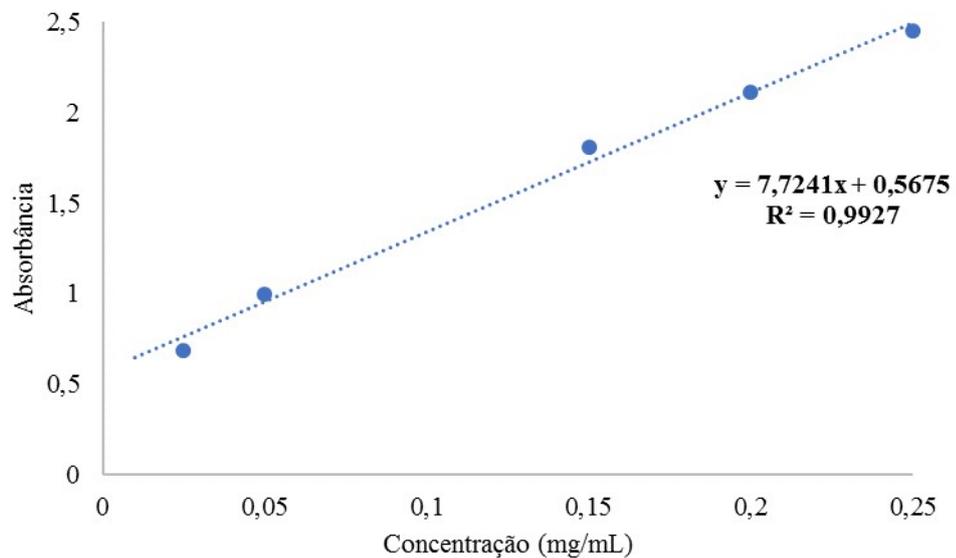
WAHYUONO, R.A.; HESSE, J.; HIPLER, U.C.; ELSNER, P.; BÖHM, V. Carotenoids of indigenous citrus species from Aceh and its in vitro antioxidant, antidiabetic and antibacterial activities. **European Food Research and Technology**, p. 1-13. 2016.

WOJTUNIK-KULESZA, K.A.; ONISZCZUK, A.; ONISZCZUK, T.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 78, p. 39-49, 2016.

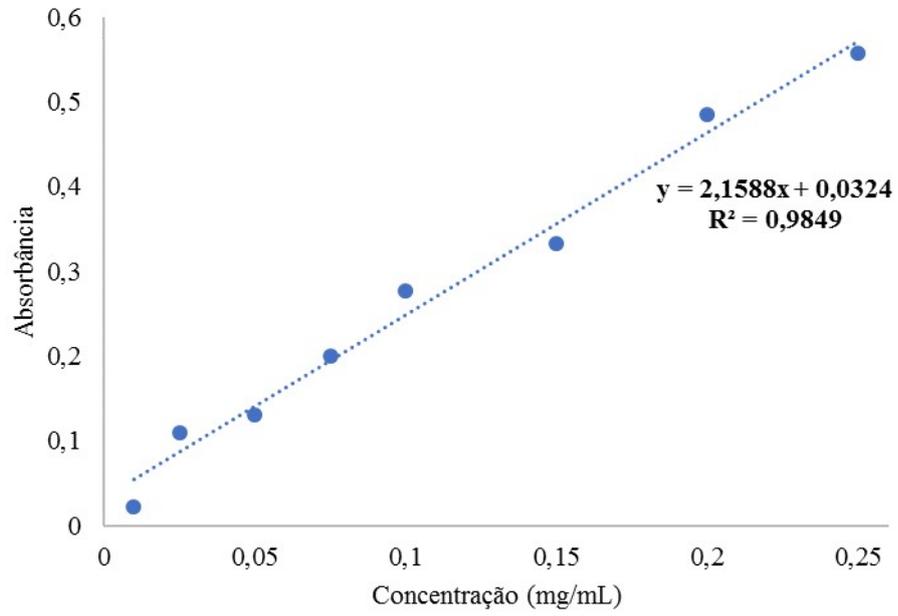
ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v.64, n. 4, p. 555-559, 1999.

## APÊNDICE

## A – FIGURAS

**Figura IA** – Curva padrão da cianidina-3-glicosídeo comercial e regressão linear tangente.**Figura IIA** – Curva padrão de ácido gálico comercial e regressão linear tangente utilizada para os cálculos de fenólicos totais do extrato de casca de araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine)

**Figura IIIA** – Curva padrão de catequina comercial e regressão linear tangente utilizada para os cálculos de flavonoides do extrato de casca de araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine)



**B – TABELAS****Tabela IA** – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t(5) do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para extração de antocianinas totais da casca do araçá-vermelho.

|  | <b>Coeficiente de<br/>Regressão</b> | <b>Erro<br/>padrão</b> | <b>t(5)</b> | <b>P</b> |
|--|-------------------------------------|------------------------|-------------|----------|
| <b>MÉDIA</b>   | 66,7994                             | 1,67                   | 39,97       | 0,000000 |
| (2) Relação massa de amostra/volume<br>de solvente (L) | -13,4003                            | 2,05                   | -6,53871    | 0,001252 |

**Tabela IIA** – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t(5) do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para extração de antocianinas totais da casca do araçá-vermelho.

|                           | <b>Coeficiente de<br/>Regressão</b> | <b>Erro padrão</b> | <b>t(5)</b> | <b>P</b> |
|---------------------------|-------------------------------------|--------------------|-------------|----------|
| <b>MÉDIA</b>              | 113,0588                            | 4,01               | 28,19       | 0,000001 |
| (1) pH (L)*               | -32,4451                            | 4,9186             | -6,59640    | 0,001203 |
| (2) Temperatura (°C) (L)* | 13,2960                             | 4,9186             | 2,70320     | 0,042621 |
| pH (Q)                    | -34,5308                            | 5,8691             | -5,88340    | 0,002015 |
| Temperatura (Q)           | -28,6705                            | 5,8691             | -4,88493    | 0,004533 |

\* Fatores estatisticamente significativos (p&lt;0,05).