



**ANA PAULA DA FONSECA MACHADO**

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO BAGAÇO  
DA AMORA-PRETA (*Rubus spp.*) UTILIZANDO LÍQUIDOS  
PRESSURIZADOS**

CAMPINAS

2014





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ANA PAULA DA FONSECA MACHADO**

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO BAGAÇO DA  
AMORA-PRETA (*Rubus spp.*) UTILIZANDO LÍQUIDOS  
PRESSURIZADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos  
para a obtenção do título de Mestra em Engenharia de Alimentos.

**Orientador: Prof. Dr. Julian Martinez**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA  
ANA PAULA DA FONSECA MACHADO E ORIENTADA  
PELO PROF. DR. JULIAN MERTÍNEZ

Assinatura do Orientador

---

CAMPINAS  
2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

M18e Machado, Ana Paula da Fonseca, 1988-  
Extração de compostos bioativos do bagaço da amora-preta (*Rubus spp.*)  
utilizando líquidos pressurizados / Ana Paula da Fonseca Machado. – Campinas,  
SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Julian Martinez.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Engenharia de Alimentos.

1. Amora-preta. 2. Resíduos. 3. Compostos fenólicos. 4. Extração com líquido  
pressurizado. I. Martinez, Julian. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Extração de compostos bioativos do bagaço da amora-preta (*Rubus spp.*) utilizando líquidos pressurizados

**Palavras-chave em inglês:**

Blackberry

Waste

Phenolic compounds

Pressurized liquid extraction

**Área de concentração:** Engenharia de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Engenharia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Julian Martinez [Orientador]

Juliana Alves Macedo

Marcos Lúcio Corazza

**Data de defesa:** 28-03-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Julian Martinez  
DEA/FEA/UNICAMP  
Orientador

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Alves Macedo  
DEPAN/FEA/UNICAMP  
Membro Titular

---

Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza  
DEQ/CP/UFPR  
Membro Titular

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Lopes de Oliveira  
DEA/FZEA/USP  
Membro Suplente

---

Dr. Rodrigo Nunes Cavalcanti  
DEA/FEA/UNICAMP  
Membro Suplente



## DEDICATÓRIA

*A Deus, por nunca me abandonar*

*A toda a minha família, em especial a minha mãezinha  
e meus irmãos queridos, João Paulo e Priscila,  
que sempre estiveram ao meu lado com  
todo seu amor, incentivo e carinho,  
sem os quais não teria  
chegado até aqui.*



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar sempre presente na minha vida, amparando a mim e a minha família nos momentos difíceis e mostrando que por meio Dele todas as coisas são possíveis. Agradeço-o também por colocar pessoas tão maravilhosas no meu caminho.

A minha GRANDE mãe, Fátima, pelo amor sem limites e por ser um exemplo de força e determinação. Foi com ela que eu aprendi que conseguimos ultrapassar qualquer barreira quando se tem fé.

Ao meu pai, Ailton, por todo apoio, amor, carinho e pelas agradáveis palavras que tanto me foram importantes nos momentos difíceis, e também nos felizes.

Aos meus irmãos, Priscila e João Paulo, pela amizade, companheirismo, carinho e por serem exemplos de pessoas de tão bom caráter. São eles que me inspiram a seguir a vida em frente com muito foco e determinação.

Aos meus primos Gabriela, Kim, Vitim e Renan pelo carinho incondicional e por as suas presenças trazerem muita felicidade à minha mãe e aos meus irmãos.

A todos os outros meus parentes, em especial aos meus tios Vicente, Sidney, Mauro, Bismarque, Marilha, Marlene, Ana Maria, Juraci, Faraildes e Tinha e às primas Cínthya, Tatiana e Kely que mesmo distantes torcem e acreditam no meu sucesso.

A Dona Cleusa, pelas orações, carinho e por cuidar tão bem da minha família.

Ao Prof. Dr. Julian Martinez, pela excelente orientação, apoio, confiança, pela oportunidade da realização desse trabalho e de participar do Programa de Estágio de Docente (PED), com ao quais eu muito aprendi, e por ser um exemplo de ser um grande profissional.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado, à FAPESP (Processos 2011/08656-7 e 2013/02203-6), CNPq (Processo 473342/2011-1) e CAPES pelo apoio financeiro neste projeto.

Ao Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por oferecer toda estrutura necessária para a realização deste trabalho.

À empresa Sítio do Bello (Paraibuna-SP) por disponibilizar a matéria-prima, resíduo de polpa de amora-preta, utilizada neste trabalho.

Aos professores da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) pelo aprendizado e conhecimento interdisciplinar, e também aos funcionários da secretaria de pós-graduação sempre prestativos.

À Profa. Dra. Mirian Dupas Hubinger (Laboratório de Engenharia de Processos - FEA) e ao prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre (Laboratório de Tratamento de Resíduos - FEA) pela disponibilidade e uso das instalações.

A todos os amigos do LAPEA e a técnica Camilla, pelo carinho, auxílios nas atividades desenvolvidas no laboratório e pela excelente convivência.

Ao Prof. Dr. Gerardo Fernández Barbero pelo carinho e pela valiosa contribuição na condução dos experimentos cromatográficos.

Aos membros da minha banca de defesa, pelas dicas, correções e sugestões.

Às minhas velhas e queridas amigas Raquel Franco, Aline Almeida, Alessandra Fernandes, Priscila Lazari, Flávia Guazzelli e Aline Gomes, e aos novos amigos conquistados, Liara Macedo, Ana Carolina Moraes, Tamires Cordeiro, Larissa Consoli, Cintia Melgaço, Laura Botti, Alisson Reis, Rafaela Carnier, Mateus Amaral e Mirela Araújo, por dividirem comigo os momentos mais agradáveis.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho e não foram aqui citados, o meu sincero agradecimento.

## RESUMO

A amora-preta é um fruto rico em compostos fenólicos, com destaque para os pigmentos antociânicos. Além do consumo *in natura*, a amora-preta é utilizada industrialmente na fabricação de sucos e derivados. Entretanto, este processamento gera cerca de 10 % de resíduos sólidos que contêm ainda uma grande porcentagem de fitoquímicos do fruto. Visando ao aproveitamento desse subproduto, o objetivo desse trabalho foi obter extratos ricos em seus principais compostos bioativos, os polifenóis, empregando a técnica limpa de extração com líquido pressurizado (PLE). Para isso, primeiramente, o bagaço da polpa da amora-preta foi caracterizado quanto ao teor de fenólicos totais (FT), antocianinas monoméricas (AM), atividade antioxidante (AA), pH, sólidos solúveis totais (SS) e composição centesimal. Em seguida, foram realizadas PLE's usando 3 temperaturas (60, 80 e 100 °C) e 4 diferentes solventes (água, água acidificada a pH 2,5, etanol e mistura de etanol e água 50 %), resultando em 12 diferentes ensaios. Nos processos de extração por PLE foram fixados a pressão (75 bar), a razão S/F (18,0), o tempo de corrida (30 min) e a massa de matéria-prima (5,0 g). Posteriormente, foram identificadas as antocianinas majoritárias e minoritárias nos extratos subcríticos por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC-QToF-MS). Além da técnica PLE, realizou-se a técnica clássica de extração Soxhlet juntamente com a maceração, com o intuito de comparar os resultados obtidos por estas com os obtidos na melhor condição de PLE. Ainda na melhor condição de extração por PLE foi realizada a cinética de extração em três diferentes vazões de solvente (1,67; 3,35 e 6,70 mL/min). Os extratos obtidos pelas diferentes técnicas foram avaliados em termos do rendimento global ( $X_0$ ), FT, AM e AA. A caracterização da matéria-prima mostrou que a mesma é altamente rica em proteínas, carboidratos, fibras e compostos bioativos (polifenóis), constituindo-se em uma boa fonte calórica e alimentícia, o que possibilita sua potencial aplicação na indústria alimentícia. Em geral, observou-se que o aumento da temperatura de 60 para 100 °C resultou em melhores valores das variáveis respostas, com exceção da AM, em que se observou uma leve diminuição. A análise por UPLC-QToF-MS mostrou que as antocianinas presentes em maior quantidade no resíduo são a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo e as minoritárias são a cianidina-3-malonil-glicosídeo e a cianidina-3-dioxalil-glicosídeo. A

condição que se considerou como a melhor foi a que utilizou a mistura hidroetanólica como solvente de extração, na temperatura de 100 °C. As variáveis respostas nesta condição obtiveram os seguintes valores: FT = 7,36 EAG/g resíduo fresco (RF), AM = 1,02 EC3G/g RF, DPPH = 76,03 ET/g RF, ABTS = 68,28 ET/g RF e  $X_0 = 6,33 \%$ . Comparando estes valores com os obtidos pelas técnicas convencionais (Soxhlet e maceração), em geral estes foram maiores. Os estudos dos parâmetros cinéticos indicam que vazões baixas são mais interessantes de se trabalhar quando se emprega mistura hidroetanólica em altas temperaturas (100 °C) via procedimento PLE. Diante de tudo isso, pode-se concluir que a técnica PLE pode ser uma alternativa promissora na extração de compostos antioxidantes.

**Palavras-chave:** Amora-preta, resíduos, compostos fenólicos, antocianinas, extração com líquido pressurizado, extração Soxhlet, maceração.

## **ABSTRACT**

Blackberry is a fruit rich in phenolic compounds, especially in anthocyanins. Besides its consumption as fresh fruit, blackberry is used industrially in the manufacture of juices and derivatives. However, this process generates about 10 % of solid residue, which still contains a large amount of phytochemicals. In order to add value to these wastes, the aim of this study was to obtain extracts rich in blackberry's major bioactive compounds, such as polyphenols, by employing the clean technique of pressurized liquid extraction (PLE). First, bagasse pulp of blackberry was characterized with respect to total phenolic content (PC), monomeric anthocyanins (MA), antioxidant activity (AA), pH, total soluble solids (SS) and chemical composition. Then, PLEs were carried out using three temperatures (60, 80 and 100 °C) and 4 different solvents (water, acidified water with pH 2.5, ethanol and a mixture of ethanol and water 50%), resulting in 12 different assays. In the extraction processes by PLE some parameters were fixed: pressure (75 bar), ratio S/F (18.0 g solvent/g fresh residue), running time (30 min) and mass of raw material (5.0 g). Subsequently, the major and minor anthocyanins were identified in subcritical extracts by Ultra performance liquid chromatography (UPLC-QTOF-MS). Besides PLE, classical Soxhlet extraction technique and maceration were performed in order to compare the results with those obtained in the best condition of PLE. Also, at the best conditions of PLE, extraction kinetics were determined at three different flow rates (1.67, 3.35 and 6.70 mL/min). The extracts obtained by the different techniques were evaluated in terms of global yield ( $X_0$ ), PC, MA and AA. The characterization of the raw material showed that it is highly rich in protein, carbohydrates, fiber and bioactive compounds (polyphenols). Thus, blackberry is a good and caloric food source, which enables its potential application in the food industry. In general, it was observed that the increase of temperature from 60 to 100 °C resulted in better values for the response variables, except for the MA, in which a slight decrease was observed. The analysis by UPLC-QToF-MS showed that cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside are the major anthocyanins present in blackberry residues. Cyanidin-3-glucoside and cyanidin-malonyl-3-dioxalil-glucoside are the anthocyanins present in lower levels. The condition that was considered the best of all tested in the present work was the one that used hydroethanolic mixture as the extraction

solvent, at a temperature of 100 °C. The values of the response variables in this condition were: PC = 7.36 EAG/g fresh residue (FR), MA = 1.02 EC3G/g (RF), DPPH = 76.03 TE/g FR, ABTS = 68.28 TE/g FR and  $X_0$  = 6.33 %. Comparing these values with those obtained by conventional techniques (Soxhlet and maceration), they were generally higher. Studies of the kinetic parameters indicated that is more interesting to work with low flow rates when employing hydroethanolic mixture at high temperatures (100 °C) via PLE procedure. Therefore, the PLE technique may be a promising alternative for the extraction of antioxidants from food matrices.

**Keywords:** Blackberry, pomace, phenolic compounds, anthocyanins, pressurized liquid extraction, Soxhlet extraction, maceration.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1 – Amora-preta da variedade Caingangue.....	7
Figura 3. 2 – Estruturas básicas de compostos fenólicos não flavonóides e flavonóides.....	16
Figura 3. 3 – Estrutura genérica dos flavonóides.....	17
Figura 3. 4 – Estrutura química das principais antocianinas encontradas na natureza.....	18
Figura 3. 5 – Transformações estruturais de antocianinas em meio aquoso em função do pH.....	20
Figura 3. 6 – Extrator Soxhlet.....	26
Figura 3. 7 – Diagrama de fase da água pura. PT e PE representam o ponto triplo e o ponto de ebulição da água pura, respectivamente.....	28
Figura 3. 8 – Diagrama esquemático de uma unidade extratora típica utilizando solvente pressurizado.....	30
Figura 3. 9 – Representação das etapas do mecanismo de extração.....	31
Figura 3. 10 – Curva da cinética de extração do processo de extração com suas etapas: taxa de extração constante (CER); taxa de extração decrescente (FER); período difusional (DC).....	32
Figura 4. 1 – Diagrama de fluxo das atividades experimentais desenvolvidas neste trabalho.....	35
Figura 4. 2 – Resíduo da polpa da amora-preta.....	37
Figura 4. 3 – Diagrama esquemático da unidade de extração com líquido pressurizado (PLE). R - Recipiente (solvente); B - Bomba de solvente; M - Manômetro; VB1 - Válvula de bloqueio 1; CE - Célula de extração revestida com manta de aquecimento; VB2 - Válvula de bloqueio 2; VM – Válvula micrométrica; T – Controlador e indicador de temperatura; VC – Vaso de coleta.....	44
Figura 4. 4 – Unidade PLE. A - Bomba de HPLC; B - Válvula de bloqueio 1; C – Manômetro; D - Célula de extração, E – Camisa de aquecimento elétrico; F – Controlador e indicador de temperatura; G – Válvula de bloqueio 2; H –Válvula micrométrica e I – Frasco de coleta.....	45
Figura 4. 5 – Esquema do empacotamento do leito da célula de PLE de aço-inox de 100 mL.....	49

Figura 4. 6 – Esquema representativo (a) e foto (b) do aparelho experimental utilizado na extração pela técnica Soxhlet.....	50
Figura 5. 1 – Rendimento de extração global ( $X_0$ ) dos extratos obtidos com líquido pressurizado expresso em porcentagem (g extrato seco/g de resíduo fresco).....	60
Figura 5. 2 – Teor de compostos fenólicos (FT) dos extratos obtidos com líquido pressurizado expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG).....	63
Figura 5. 3 – Teor de antocianinas monoméricas (AM) dos extratos obtidos com líquido pressurizado expresso em equivalentes de cianidina-3-glicosídeo (EC3G).....	65
Figura 5. 4 – Atividade antioxidante (AA) dos extratos obtidos com líquido pressurizado expresso em $\mu\text{mol}$ equivalente de Trolox (ET), analisados pelo (a) método DPPH e (b) método ABTS.....	68
Figura 5. 5 – Curvas globais de extração em diferentes vazões.....	75
Figura A.9. 1 – Curva padrão de ácido gálico (AG) obtida da absorbância em 760 nm <i>versus</i> a concentração de AG (mg/mL).....	89
Figura A.9. 2 – Curva padrão de Trolox obtida da % Inibição (PI) <i>versus</i> concentração de Trolox ( $\mu\text{M}$ ) para se determinar a atividade antioxidante pelo método DPPH.....	89
Figura A.9. 3 – Curva padrão de Trolox obtida da absorbância em 734 nm <i>versus</i> concentração de Trolox ( $\mu\text{M}$ ) para se determinar a atividade antioxidante pelo método ABTS.....	90
Figura A.9. 4 – Cromatograma do íon da antocianina Cianidina-3-glucosídeo (majoritária) de massa = 449 (m/z).....	93
Figura A.9. 5 – Cromatograma do íon da antocianina Cianidina-3-malonil-glicosídeo (minoritária) de massa = 535 (m/z).....	94
Figura A.9. 6 – Cromatograma do íon da antocianina Cianidina-3-dioxalil-glicosídeo (minoritária) de massa = 593 (m/z).....	95
Figura A.9. 7 – Cromatograma do íon da antocianina Cianidina-3-rutinosídeo (majoritária) de massa = 595 (m/z).....	96
Figura A.9. 8 – Curva padrão de cianidina-3-glicosídeo (C3G), área dos picos <i>versus</i> concentração de C3G (mg/L).....	97

Figura A.9. 9 – Curva padrão de cianidina-3-rutinosídeo (C3R), área dos picos <i>versus</i> concentração de C3R (mg/L).....	97
Figura A.9. 10 – Curva padrão de cianidina-3-malonil-glicosídeo (C3MG), área dos picos <i>versus</i> concentração de C3MG (mg/L).....	98
Figura A.9. 11 – Curva padrão de cianidina-3-dioxalil-glicosídeo (C3DG), área dos picos <i>versus</i> concentração de C3DG (mg/L).....	98



## LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1 – Perfil nutricionl da amora-preta em 100 g de fruto.....	11
Tabela 4. 1 – Análises e métodos utilizados na caracterização química do resíduo de amora-preta.....	38
Tabela 4. 2 – Planejamento experimental dos ensaios de extração por PLE.....	46
Tabela 4. 3 – Parâmetros operacionais adotados para os ensaios de extração por PLE.....	47
Tabela 5. 1 – Composição química do resíduo da polpa da amora-preta ( <i>Rubus spp.</i> ) variedade Caingangue.....	55
Tabela 5. 2 – Resultados obtidos da extração com líquido pressurizado a partir do bagaço da amora-preta.....	58
Tabela 5. 3 – Relação massa/carga (m/z) das antocianinas identificadas.....	69
Tabela 5. 4 – Concentração de compostos fenólicos antociânicos dos extratos obtidos das 12 diferentes condições por PLE.....	71
Tabela 5. 5 – Resultados obtidos das extrações convencionais e da melhor condição da extração com líquido pressurizado a partir do bagaço da amora-preta.....	73
Tabela A.9. 1 – Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o rendimento global de extração $X_0$ (%) das extrações por PLE.....	90
Tabela A.9. 2 – Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o teor de fenólicos totais (FT) das extrações por PLE.....	91
Tabela A.9. 3 – Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre a concentração das antocianinas monoméricas (AM) das extrações por PLE.....	91
Tabela A.9. 4 – Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre a atividade antioxidante, pelo método DPPH, das extrações por PLE.....	91
Tabela A.9. 5 – Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre a atividade antioxidante, pelo método ABTS, das extrações por PLE.....	92
Tabela A.9. 6 – Dados experimentais obtidos para a construção da curva global de extração na vazão de mL/min.....	1,67 99

Tabela A.9. 7 – Dados experimentais obtidos para a construção da curva global de extração na vazão de 3,35 mL/min.....	100
Tabela A.9. 8 – Dados experimentais obtidos para a construção da curva global de extração na vazão de 6,70 mL/min.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA: Atividade Antioxidante

AM: Teor de antocianinas monoméricas

C3DG: Cianidina-3-dioxalil-glicosídeo

C3G: Cianidina-3-glicosídeo

C3MG: Cianidina-3-malonil-glicosídeo

C3R: Cianidina-3-rutinosídeo

CE: Célula de extração

CER: Etapa de taxa de extração constante (*constant extraction rate*)

CT: Controlador de Temperatura

DC: Etapa Difusional (*diffusion controlled period*)

DP: Desvio padrão

EAG: Equivalente de ácido gálico

EC3G: Equivalente de cianidina-3-glicosídeo

ET: Equivalente trolox

FD: Fator de diluição

FER: Etapa de taxa de extração decrescente (*falling extraction rate*)

FT: Teor de fenólicos totais

GRAS: *Generally recognised as safe*

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*)

M: Manômetro

$M_{extrato}$ : Massa de extrato

MM: Massa molecular

OEC: Curvas globais de extração (*overall extraction curve*)

PI: Porcentagem de inibição

PLE: Extração com líquido pressurizado (*pressurized liquid extraction*)

PRM: Produtos da reação de Maillard

RF: Resíduo fresco

S/F: *Solvent/Feed* (razão entre massa de solvente e massa de matéria-prima g/g)

SS: Sólidos solúveis totais

$t_{\text{CER}}$ : Duração do período CER

TM: Transferência de massa

UPLC-QToF-MS: Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas quadrupolo (*ultra performance liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*)

VB: Válvula de bloqueio

VM: Válvula micrométrica

$X_0$ : Rendimento global de extração

$\epsilon$ : Absortividade molar

$\lambda$ : Comprimento de onda

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	ix
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xxi
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 OBJETIVO GERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 AMORA PRETA ( <i>Rubus spp.</i> ) .....	7
3.1.1 Aspectos Nutricionais.....	10
3.1.2 Fitoquímicos e Saúde Humana .....	12
3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	14
3.2.1 Flavonóides.....	16
3.2.1.1 <i>Antocianinas</i> .....	17
3.3 BAGAÇO .....	21
3.4 EXTRAÇÃO .....	23
3.4.1 Métodos Clássicos de Extração .....	25
3.4.1.1 <i>Extração Soxhlet</i> .....	25
3.4.1.2 <i>Extração por Maceração</i> .....	26
3.4.2 Extração com Líquido Pressurizado (PLE) .....	27
3.4.3 Cinética de Extração – Curvas Globais de Extração (OEC) .....	31

3.4.4 Aplicações dos Extratos de Frutas Vermelhas .....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 REAGENTES.....	35
4.2 EQUIPAMENTOS .....	36
4.3 MATÉRIA-PRIMA .....	36
4.3.1 Origem.....	36
4.3.2 Caracterização Química.....	37
4.3.2.1 <i>Análise da Composição Centesimal, SS e pH</i> .....	38
4.3.2.2 <i>Teor de Fenólicos Totais (FT)</i> .....	39
4.3.2.3 <i>Teor de Antocianinas Monoméricas Totais (AM)</i> .....	40
4.3.2.4 <i>Atividade Antioxidante Total (AA)</i> .....	41
4.4 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO .....	44
4.2.1 Unidade de Extração.....	44
4.2.2 Condições de Extração .....	45
4.2.3 Procedimento Operacional de Extração .....	47
4.2.3.1 <i>Preparo do Leito de Extração</i> .....	48
4.5 EXTRAÇÃO CONVENCIONAL: SOXHLET .....	49
4.6 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO GLOBAL ( $X_0$ ) .....	51
4.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS .....	51
4.7.1 Identificação das Antocianinas por UPLC-QToF-MS .....	52
4.7.2 Separação e Quantificação das Antocianinas por HPLC-DAD.....	53
4.8 ESTUDO CINÉTICO DE EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO .....	53
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO RESÍDUO .....	55

5.2 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDOS PRESSURIZADOS .....	57
5.2.1 Rendimento Global de Extração ( $X_0$ ) .....	59
5.2.2 Caracterização Química dos Extratos.....	61
5.2.2.1 <i>Compostos Fenólicos Totais</i> .....	61
5.2.2.2 <i>Antocianinas Monoméricas</i> .....	64
5.2.2.3 <i>Atividade Antioxidante – Métodos DPPH e ABTS</i> .....	66
5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS PRESENTES NOS RESÍDUOS SUBCRÍTICOS DA AMORA-PRETA .....	69
5.4 COMPARAÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO PLE COM OS MÉTODOS CONVENCIONAIS .....	72
5.5 CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO .....	73
6. CONCLUSÕES .....	77
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81
9. ANEXOS .....	89
9.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS .....	89
9.1.1 Curvas Padrões .....	89
9.1.2 Análises de Variância (ANOVA).....	90
9.1.3 Cromatogramas dos íons das antocianinas analisadas via UPLC-MS .....	92
9.1.4 Curvas Padrão das Antocianinas .....	97
9.1.5 Cinéticas de Extração .....	99



## **1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

O processamento de alimentos de origem vegetal, além de produzir o produto principal que será realmente comercializado, gera grandes quantidades de subprodutos que não são aproveitados pela indústria. A eliminação destes subprodutos representa um custo adicional e um potencial impacto negativo sobre o meio ambiente. Diante disso, pesquisadores vêm estudando cada vez mais o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem o reaproveitamento desses resíduos (subprodutos), ao mesmo tempo em que sejam ambientalmente seguras (limpas) e que garantam a qualidade do produto final. Pesquisas ao longo dos últimos 20 anos revelaram que muitos destes subprodutos podem servir como uma fonte potencialmente valiosa de compostos bioativos (Wijngaard *et al.*, 2012). Além disso, tem sido observado nos últimos anos um crescente interesse por produtos naturais, como resultado da conscientização dos consumidores na busca por uma melhor qualidade de vida e a preocupação destes com a segurança dos produtos utilizados ou ingeridos - incluindo a ingestão de produtos compostos por substâncias naturais que ofereçam benefícios para o corpo. Tal preocupação está impulsionando as indústrias alimentícias, de cosméticos, farmacêuticas e químicas na obtenção e utilização de extratos vegetais que apresentem características funcionais (biológicas), corantes ou aromatizantes, com alto grau de pureza, uma vez que substâncias sintéticas, muitas vezes, são suspeitas de causar efeitos maléficos à saúde. O isolamento desses compostos naturais possibilita o aproveitamento dos subprodutos gerados na agroindústria e podem resultar em novas alternativas empresariais, além de minimizar o impacto ambiental causado pelo acúmulo desses resíduos (Galvão, 2004; Oliveira, 2010; Santos, 2011).

A amora-preta (*Rubus spp.*), fruta nativa do hemisfério norte, denominada *blackberry*, é uma das pequenas frutas vermelhas mais ricas em antioxidantes já estudadas, caracterizando-a dessa forma como uma fonte valiosa de compostos fitoquímicos (bioativos) (Kaume, Howard e Devareddy, 2011). Seu cultivo tem se tornado uma alternativa muito atraente frente ao de outras fruteiras por ter menores custos de implantação e manutenção do pomar, apresentando, por exemplo, um índice de lucratividade de cerca de 78 %. Os custos mais baixos devem-se principalmente ao fato de se tratar de uma cultura rústica, com menor incidência de pragas e maior adaptação aos

diferentes tipos de solo e condições climáticas (Antunes, 2002; Antunes, Filho e Souza, 2003).

A amora-preta apresenta um conteúdo particularmente elevado de compostos fenólicos, tanto na casca quanto na polpa. Estes compostos são, principalmente, os flavonóides (antocianinas), taninos e ácidos fenólicos. Os polifenóis contribuem para a proteção contra doenças degenerativas, e seus efeitos sobre a saúde têm sido atribuídos principalmente às suas propriedades antioxidantes. As antocianinas são as substâncias responsáveis pela cor vermelha do fruto. Além destes, a amora contém outros fitoquímicos, como vitamina C e carotenóides, que também possuem caráter antioxidante (Seeram, 2006; Pertuzatti, 2009; Paredes-López et al., 2010; Kaume, Howard e Devareddy, 2011).

Atualmente, a cultura da amoreira-preta no Brasil apresenta expressivo destaque nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e sul de Minas Gerais, locais onde a ocorrência de períodos de frio favorece o desenvolvimento da planta. Esta cultura nestes estados ocupa o segundo lugar dentre as “pequenas frutas”, com produção de 1300 toneladas e área cultivada de 110 hectares (Antunes *et al.*, 2000; Antunes e Raseira, 2004; Jacques *et al.*, 2010). No Rio Grande do Sul esta cultivar responde por 70 % da área cultivada. A colheita destas frutas ocorre entre meados de novembro a início de janeiro (Antunes, 2002).

Além do consumo *in natura*, a amora-preta é utilizada industrialmente na fabricação de sucos e derivados (Antunes, 2002). Entretanto, de forma geral, o processamento dessa pequena fruta vermelha gera em torno de 10 % de resíduo sólido (bagaço) que é composto basicamente de casca e sementes contendo ainda uma grande porcentagem de fitoquímicos do fruto (Pertuzatti, 2009; Santiago, 2010; Souza *et al.*, 2010). O aproveitamento deste resíduo como matéria-prima no processamento de novos alimentos é de grande interesse econômico e representa um segmento importante nas indústrias, pois agrega valor ao subproduto e reduz o acúmulo dos mesmos.

A recuperação de compostos fitoquímicos a partir dos resíduos sólidos tem sido relatada utilizando tecnologias convencionais e alternativas. Como exemplos das primeiras têm-se: extração em aparelho de Soxhlet, extração por maceração, por infusão e por arraste de vapor d'água; e das segundas têm-se: extração com fluido supercrítico (SFE), extração

com líquido pressurizado (PLE) e extração com fluidos pressurizados assistida com ultrassom.

Os métodos convencionais geralmente consomem muito tempo - podendo degradar compostos de interesse durante o processo extrativo - e requerem uma grande quantidade de solventes orgânicos (como etanol, metanol, acetona e clorofórmio), que em alguns casos são prejudiciais à saúde e causam danos ambientais, havendo a necessidade de separá-los do extrato posteriormente e descartá-los de forma adequada. Assim, a técnica de extração com líquido pressurizado (PLE - *pressurized liquid extraction*), também denominada como extração acelerada com solventes (ASE), surgiu como uma alternativa para a extração e fracionamento de produtos naturais, através de uma tecnologia limpa e com a possibilidade de ajustar parâmetros visando à seletividade do processo para um grupo de compostos a serem extraídos, o que é uma boa opção para agregar valor a subprodutos da indústria processadora da amora-preta. A PLE, utilizando a água e o etanol como solventes de extração, é um dos métodos mais interessantes, uma vez que se tratam de solventes GRAS (*Generally Recognised as Safe*) (Wiboonsirikul e Adachi, 2008; Monrad *et al.*, 2010; Oliveira, 2010).

A PLE permite a extração rápida dos analitos em um ambiente fechado e inerte sob alta pressão e temperatura. Uma grande vantagem da PLE sobre os métodos convencionais de extração conduzidos por solventes à pressão atmosférica é a de que os solventes sob alta pressão permanecem no estado líquido, mesmo estando submetidos a temperaturas bem acima dos seus pontos de ebulição, permitindo, dessa maneira, trabalhar a altas temperaturas de extração. Estas condições melhoram a solubilidade dos analitos no solvente e a cinética de dessorção a partir de matrizes (Santos, 2011).

Neste contexto, como já se sabe que o subproduto gerado do processo de produção de suco e derivados da amora-preta contêm substâncias que podem trazer algum benefício à saúde humana (Balasundram, Sundram e Samman, 2006; Paredes-López *et al.*, 2010; Nile e Park, 2013), a justificativa para a realização do presente trabalho está baseada em tentar recuperar estas substâncias através de técnicas ambientalmente seguras, já que o isolamento delas possibilita o aproveitamento desse resíduo, contribuindo dessa forma na agregação de valor a este subproduto e ainda, para minimizar os impactos negativos causados pelo seu descarte diretamente na natureza.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Obtenção de extratos contendo compostos bioativos, tais como os polifenóis (antocianinas), a partir do resíduo gerado no processamento da polpa da amora-preta (*Rubus spp.*), através da utilização do processo de extração com líquido pressurizado (PLE).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para alcançar o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

a) Caracterização (via processo maceração) das amostras do resíduo da amora-preta em termos da sua composição centesimal, pH, teor de compostos fenólicos totais (FT), antocianinas monoméricas (AM) e atividade antioxidante (AA);

b) Extração de compostos bioativos do resíduo, empregando a técnica de extração com líquido pressurizado (PLE) utilizando água, água acidificada pH 2,5, etanol e a mistura de etanol e água (50 % etanol v/v) como solventes, nas temperaturas de 60, 80 e 100 °C;

c) Extração do resíduo da polpa da amora-preta empregando o método convencional Soxhlet;

d) Determinação dos rendimentos de extração global ( $X_0$ ) das diferentes condições empregadas;

e) Caracterização dos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração em termos do teor de compostos fenólicos totais (FT), antocianinas monoméricas (AM) e atividade antioxidante (AA – métodos DPPH e ABTS);

f) Identificação e quantificação das antocianinas majoritárias e minoritárias presentes nos extratos da PLE;

g) Determinação da melhor condição de temperatura e solvente, em termos de rendimento ( $X_0$ ) e qualidade dos extratos (FT, AM e AA) e comparação destes resultados com os obtidos pela técnica de Maceração e Soxhlet;

h) Determinação das curvas cinéticas de extração na melhor condição de extração e avaliação do efeito da vazão do solvente;

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 AMORA PRETA (*Rubus spp.*)**

A amoreira-preta é classificada como pertencente à família *Rosaceae*, ao gênero *Rubus* e subgênero *Eubatus*, constituindo um grupo variado e complexo de plantas. Muitas são nativas do hemisfério norte, Ásia e Europa, mas algumas ocorrem em regiões tropicais montanhosas no hemisfério sul (Moore, 1984; Poling, 1996; Antunes, 2002).

Esta frutífera é uma espécie arbustiva de porte ereto ou rasteiro, que produz frutos agregados com cerca de quatro a sete gramas, de coloração avermelhada a negra e sabor ácido a doce-ácido (Facchinello, Hoffmann e Santos, 1994; Antunes, 2002). É uma planta rústica, de clima temperado, que apresenta baixo custo de produção, facilidade de manejo, requer pouca utilização de defensivos agrícolas, sendo por isso uma alternativa interessante do cultivo na agricultura familiar (Mota, 2006).

O fruto verdadeiro da amoreira (Figura 3.1) é denominado de mini drupa ou drupete, no qual existe uma pequena semente, sendo que a sua junção forma o que é chamado de fruto agregado (Poling, 1996; Antunes, 2002).



**Figura 3. 1** – Amora-preta da variedade Caingangue.

A amoreira-preta (*Rubus spp.*), está entre as culturas consideradas como de “pequenos frutos” (*small fruits*) e também conhecidas como *berries*, cujos termos vêm sendo comumente usado para descrever qualquer fruta pequena, de cor vermelha, roxa ou negra; de sabor adocicado e formato arredondado (Jepson e Craig, 2005; Paredes-Lopez *et al.*,

2010), como framboesas, mirtilo, morango, cerejas e amoras-pretas cultivadas na América, Europa, África e Ásia (Lorenzi *et al.*, 2006).

Estas “pequenas frutas” além dos nutrientes essenciais e dos micronutrientes contribuem com diversos componentes oriundos do metabolismo secundário, principalmente os de natureza fenólica. O consumo delas está associado com baixo risco de incidência e mortalidade por câncer e doenças cardíacas, devido à presença destes compostos, especialmente flavonoides e antocianinas, os quais revelam grande capacidade de reagir com radicais livres e, portanto, contribuem na prevenção de doenças cardiovasculares, circulatórias, neurológicas e cancerígenas (Lorenzi *et al.*, 2006). Estes compostos apresentam ainda atividade anti-inflamatória, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana e antineoplásica (Paredes-Lopez *et al.*, 2010).

A amora-preta *in natura* é altamente nutritiva. Contêm 85% de água, 10% de carboidratos, com elevado conteúdo de minerais, vitaminas B, A e cálcio, além de compostos funcionais, como ácidos fenólicos e antocianinas, que lhes conferem a coloração vermelho púrpura. Podem ser utilizadas para confecção de doces, geleias, polpas, suco, sorvete e iogurtes (Poling, 1996; Antunes, 2002).

Existem muitas espécies de amoras constituindo um grupo extremamente diversificado e complexo variando os seus frutos em peso e tamanho. Os frutos são delicados e suculentos, saborosos e aromáticos. Apresentam formas arredondas e a dimensão e o peso são muito variáveis (Sousa *et al.*, 2007).

São numerosas as cultivares conhecidas e comercializadas, mas as que mais se destacam e que contribuem para a produção mundial são: Cherster Thornless, Lock Ness, Triple Crown, Kotata, Shawnee, Navaho, Kiowa, Arapaho, Apache, Thornless Evergren, Marion, Silvan e Boysen. Atualmente as duas mais importantes são a Brazos e a Tupi (Sousa *et al.*, 2007).

O cultivo da amoreira-preta começou na segunda metade do século XIX nos Estados Unidos, onde é conhecida como *blackberry*. No Brasil, as primeiras cultivares foram introduzidas em 1972, no Centro de Pesquisa da Embrapa Clima Temperado, localizada em Pelotas-RS. Esta cultura apresentou boa adaptação e tem alcançado alta produtividade devido às condições climáticas desta região, a qual permite o cultivo de frutas das espécies de clima temperado. Além das cultivares inicialmente introduzidas, Brazos,

Comanche e Cherokee, a Embrapa Clima Temperado desenvolveu um programa de melhoramento genético originando as cultivares Ébano, Negrita, Tupy, Guarani, Caingangue e Xavante (Raseira, Santos e Madail, 1984; Raseira, Santos e Raseira, 1992; Antunes, 2002).

Atualmente, a cultura da amoreira-preta no Brasil apresenta expressivo destaque nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e sul de Minas Gerais, locais onde a ocorrência de períodos de frio favorece o desenvolvimento da planta. Esta cultura nestes estados ocupa o segundo lugar dentre as “pequenas frutas”, com produção de 1300 toneladas e área cultivada de 110 hectares (Antunes *et al.*, 2000; Antunes e Raseira, 2004; Jacques *et al.*, 2010).

Segundo relatos de Chim (2008), atualmente a cultivar Tupy é a mais cultivada no Brasil, a qual resultou do cruzamento das cultivares Uruguai e Comanche, realizado pela Embrapa Clima Temperado em 1982. No Rio Grande do Sul esta cultivar responde por 70% da área cultivada. A colheita destas frutas ocorre entre meados de novembro a início de janeiro (Antunes, 2002).

A amora-preta apresenta estrutura frágil e alta taxa respiratória, com isso seu período para consumo *in natura* é muito reduzido; portanto, a utilização desta fruta na forma processada ou industrializada é uma alternativa para prorrogar o período de consumo após colheita. Os frutos podem ser congelados, enlatados, processados na forma de polpa para utilização em produtos lácteos (como matéria-prima ou aditivo de cor e sabor), sucos e geleias (Antunes, 2002; Antunes, Filho e Souza, 2003).

De acordo com Nelson e Tressler (1980), o grande mercado para produtos de amora-preta é gerado a partir do suco clarificado e concentrado; base da elaboração de uma vasta gama de produtos, como caldas para sorvetes, geleias, xaropes, bebidas alcoólicas e refrescos. Também pode ser utilizado para confecção de misturas com suco de outras frutas. Além desta versatilidade, a tecnologia de industrialização é simples e acessível.

No entanto, após o processamento podem ocorrer alterações das características funcionais originais das frutas, mas o impacto do processamento sobre as propriedades funcionais da amora-preta ainda está sendo estudado. Existem alguns estudos que relatam estas alterações, como os de Jacques *et al.* (2010); Chim (2008) e Mota (2006) os quais avaliaram a estabilidade de alguns dos principais fitoquímicos da amora-preta em produtos

como polpa, geleia e suco respectivamente. No entanto, sabe-se que frutas e hortaliças respondem de forma diferenciada ao processo de transformação.

### 3.1.1 Aspectos Nutricionais

A amora-preta *in natura* é altamente nutritiva (Vizzotto, 2008; Kaume, Howard e Devareddy, 2011), conforme se observa a sua composição apresentada na Tabela 3.1. Fatores genéticos e ambientais, tais como o tipo de cultivar, maturidade, a exposição à luz UV, condições de crescimento e método de colheita e armazenamento, desempenham um papel importante na composição química do fruto (Parr e Bolwell, 2000; Siriwoharn *et al.*, 2004).

Em adição aos compostos polifenólicos valiosos, amoras contêm carboidratos e várias vitaminas e minerais essenciais (Tabela 3.1).

O teor de água nestes frutos varia entre 83 a 91% (Tabela 3.1). Os açúcares constituem a maior parte dos compostos solúveis e os mais representativos são a glicose, frutose e a sacarose (Tabela 3.1), num quantitativo de 99% do total dos açúcares nos frutos maduros. Níveis de glicose, frutose, açúcares totais e sólidos solúveis totais aumentam significativamente com o amadurecimento da fruta (Sousa *et al.*, 2007).

Os ácidos orgânicos e os açúcares, são importantes componentes do sabor e aroma dos frutos. Nas amoras os principais ácidos são o ácido málico (280 mg/100 g), o lactoisocítrico (293 mg/100 g), o isocítrico (599 mg/100 g), o cítrico (572 mg/100 g) e pequenas quantidades de ácidos ascórbico, fosfórico, fumárico, shiquímico e quínico (Sousa *et al.*, 2007; Kaume, Howard e Devareddy, 2011).

Estes ácidos orgânicos em amoras são importantes para a estabilização das antocianinas e do ácido ascórbico e para estender a vida de prateleira de frutas frescas e processadas (Kaume, Howard e Devareddy, 2011).

Além dos nutrientes mencionados anteriormente e os contidos na Tabela 3.1, fazem parte ainda da composição da amora-preta os seguintes compostos: folato, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, ácido elágico, ácidos graxos saturados, ácidos graxos monossaturados e ácidos graxos polinsaturados (Jacques e Zambiasi, 2011; Kaume, Howard e Devareddy, 2011).

**Tabela 3. 1** – Perfil nutricionl da amora-preta em 100 g de fruto.

<b>Nutrientes em 100 g de fruto</b>	
Valor energético	50-55 kcal
Umidade	83 -91 g
Proteínas	1,3-1,5 g
Lipídios	0,5 g
Carboidratos	6-13 g
Fibras	3,5-5,5 g
Cinzas	0,19-0,47 g
Açúcares Total	4,88 g
Glucose	2,31-3,24 g
Frutose	2,4-2,8 g
Sacarose	0,07 g
Maltose	0,07 g
Galactose	0,03 g
<b>Sais minerais</b>	
Cálcio	29-32 mg
Ferro	0,57 mg
Magnésio	20 mg
Fósforo	22 mg
Potássio	196 mg
Sódio	1 mg
Zinco	0,53 mg
Cobre	0,17 mg
Selênio	0,4-0,6 mg
Manganês	0,65 mg
<b>Vitaminas e outras componentes</b>	
Vitamina C	21 mg
Vitamina A	214 mg
Vitamina K	19 mg
Vitaminas B6 e B12	0,03 mg
Fenólicos Totais	250-900 mg
Carotenoides Totais	450 mg
Antocianinas Totais	70-300 mg

Fontes: Kaume, Howard e Devareddy (2011) e Vizzotto (2008).

A acidez total de amora-preta pode variar de 1 a 4 % e o pH de 2 a 4. Já a variação dos sólidos solúveis tem uma grande amplitude, de 7,5 a 16,1 % sendo o balanço entre acidez e sólidos solúveis o responsável pelo sabor característico (Vizzotto, 2008).

Ainda na amora-preta, são encontradas substâncias denominadas como fotoquímicos ou compostos secundários. Estas substâncias são produzidas naturalmente pelas plantas para se protegerem do ataque de pragas e doenças, e também ajudam a planta a resistir a condições adversas do ambiente. Muitos destes fitoquímicos atuam na prevenção e no combate de doenças crônicas degenerativas como o câncer e as doenças cardiovasculares. Exemplos de fitoquímicos encontrado em amora-preta são as antocianinas, que dão a coloração vermelha e roxa das frutas, os carotenoides que são responsáveis pela coloração alaranjada, e ainda, existem vários outros fitoquímicos que não apresentam cor como os ácidos fenólicos, por exemplo, mas são de grande importância para a saúde (Sellappan, Akoh e Krewer, 2002; Zadernowski, Naczki e Nesterowicz, 2005).

A concentração dos compostos fitoquímicos presentes na amora-preta é influenciada por fatores como o tipo de cultivar, das condições ambientais e climáticas na pré-colheita, das doenças da planta, dos procedimentos de colheita, do ponto de maturação na colheita, da localização geográfica, da exposição à luz solar, das condições de estocagem pós-colheita e do tipo de processamento a que é submetido o fruto. Os estudos realizados ao redor do mundo demonstram que o consumo de frutas e hortaliças está relacionado à prevenção das doenças crônicas, provavelmente, devido ao aumento no consumo de compostos antioxidantes (Sellappan, Akoh e Krewer, 2002; Zadernowski, Naczki e Nesterowicz, 2005).

De um modo geral, os compostos considerados bioativos presente na amora-preta podem atuar na saúde humana como quimioprotetores em virtude do seu potencial antioxidante.

### **3.1.2 Fitoquímicos e Saúde Humana**

A amora-preta já é considerada uma fruta funcional, ou seja, além das características nutricionais básicas, quando consumida como parte usual da dieta, produz efeito fisiológico/metabólico ou efeito benéfico à saúde humana, devendo ser segura para consumo sem supervisão médica. Este efeito se deve, principalmente, a ação antioxidante dos fitoquímicos; compostos fenólicos, tocoferóis, ácido ascórbico, carotenoides e antocianinas; encontrados naturalmente neste fruto. Estas últimas estão em abundância e

conferem a cor característica da fruta (Wang e Jiao, 2000; Sellappan, Akoh e Krewer, 2002; Kaume, Howard e Devareddy, 2011; Nile e Park, 2013).

Os frutos da amora são classificados como uma das frutas frescas mais ricas em antioxidantes já estudadas, perdendo, praticamente, apenas para o mirtilo (Jacques e Zambiasi, 2011; Kaume, Howard e Devareddy, 2011).

Devido aos seus elevados níveis de compostos fenólicos, a amora-preta foi relatado como tendo múltiplos efeitos biológicos, incluindo atividade antimicrobiana, anticarcinogênica e anti-inflamatória (Nile e Park, 2013)

A alta capacidade antioxidante encontrada nesta fruta atua na neutralização dos radicais livres, moléculas instáveis que estão ligadas ao aparecimento de um grande número de doenças crônicas não transmissíveis, como as doenças cardiovasculares, e o câncer. A amora-preta apresenta atividade antioxidante frente aos radicais superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e ao oxigênio singlete ( $O_2$ ) (Wang e Jiao, 2000; Serraino *et al.*, 2003).

Estudos demonstram que extratos de amora-preta apresentam efeitos antimutagênicos (Tate *et al.*, 2006) e anticarcinogênicos para as linhagens humanas de câncer de útero, de cólon (Lazze *et al.*, 2004), oral, de mama, de próstata (Seeram *et al.*, 2006) de pulmão (Ding *et al.*, 2006). Segundo Tate *et al.* (2006), extratos de amora-preta podem prevenir a formação de metástase. Em muitos casos o efeito anticarcinogênico da amora-preta ocorre devido ao efeito anti-inflamatório de seus extratos. Além disso, o fruto da amoreira é depurativo do sangue, anti-séptico, vermífugo, digestivo, calmante, diurético e laxativo (Ding *et al.*, 2006; Tate *et al.*, 2006).

A amora- preta contém pectina em abundância, uma fibra solúvel que ajuda a reduzir os níveis de colesterol no sangue, atuando na prevenção de enfermidades cardiovasculares e circulatórias (Stoclet *et al.*, 2004). Ainda, esta fruta atenua os riscos e sintomas do diabetes e do mal de Alzheimer (Ishige, Schubert e Sagara, 2001; Abdille *et al.*, 2005).

Foi demonstrado que o ácido elágico, presente nessa fruta, também possui funções antimutagênica, anticancerígena e além de ser um potente inibidor da indução química do câncer. O ácido elágico têm mostrado propriedades inibidoras contra replicação do vírus HIV transmissor da Aids e do vírus da herpes (Maas, Galletta e Stoner, 1991; Wang *et al.*, 1994).

Além disso, são atribuídas às frutas de amoreira-preta outras propriedades, como o controle de hemorragias em animais e seres humanos, controle da pressão arterial e efeito sedativo, complexação com metais, função antioxidante, ação contra crescimento e alimentação de insetos (Maas, Galletta e Stoner, 1991).

Como pode se ver, o consumo de frutas e hortaliças como a amora-preta, em conjunto com um estilo de vida saudável, incluindo dieta equilibrada e exercícios físicos, pode ajudar a prevenir alguns tipos de doenças.

### **3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS**

Os compostos fenólicos ou polifenóis são substâncias amplamente distribuídas na Natureza, mais de 8.000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas. Esse grande e complexo grupo faz parte dos constituintes de uma variedade de vegetais, frutas, em destaque as frutas vermelhas como a amora-preta, e produtos industrializados (Bravo, 1998).

A presença de compostos fenólicos específicos em cada fruta pode estar relacionada a fatores como o tipo de fruta, variedade, localização geográfica da planta, condições ambientais e climáticas durante o crescimento da mesma (fertilização, temperatura, luz e água), assim como com a incidência de doenças (King e Young, 1999). Os níveis de compostos fenólicos podem ser influenciados por fatores como condições de amadurecimento e armazenamento pós-colheita dos frutos e por processos tecnológicos utilizados na elaboração e armazenamento dos produtos derivados (Zadernowski, Naczki e Nesterowicz, 2005).

Os polifenóis são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, poluição, dentre outros (Naczki e Shahidi, 2006), protegendo contra patógenos e predadores (Bravo, 1998).

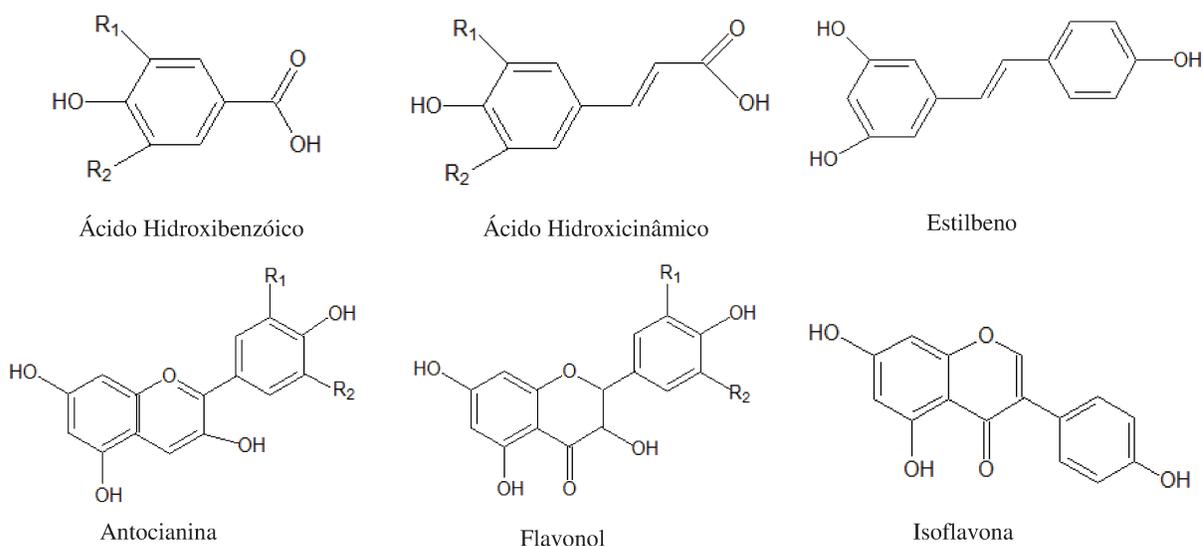
Em alimentos, os compostos fenólicos são responsáveis pela cor, sabor, adstringência e estabilidade oxidativa, além de estarem envolvidos no processo de crescimento e reprodução das plantas e caracterizarem propriedades antimicrobianas e inseticidas nas mesmas. Mas, recentemente, o reconhecimento das propriedades antioxidantes destes

compostos tem evocado uma nova visão em direção aos efeitos benéficos para a saúde que eles podem apresentar. Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de neutralizadores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação (Oliveira, 2010).

Em geral os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais livres através da doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática, que possui a capacidade de suportar um elétron desemparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula; quelando metais de transição, como o  $\text{Fe}^{2+}$  e o  $\text{Cu}^+$ ; interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio; reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais livres (Bianchi e Antunes, 1999; Karakaya, 2004).

Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila, incluindo seus grupos funcionais. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura, particularmente do número e da posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos. De acordo com sua estrutura química, podem ser divididos em dois grandes grupos: os flavonoides, subdivididos em flavonas, flavanóis, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas, e os não flavonoides, que compreendem os grupos dos ácidos fenólicos, ligninas, taninos e estilbenos (Li *et al.*, 2009; Jacques e Zambiasi, 2011). A Figura 3.2 apresenta alguns exemplos da estrutura química destes compostos.

Relatos da literatura demonstram uma variabilidade no conteúdo de compostos fenólicos totais em amora-preta de 261,95 a 929,62 mg equivalente de ácido gálico/100 g de fruta fresca (Vizzotto, 2008), 569,89 mg ácido gálico/100 g fruta (Chim, 2008), até 1.938,70 mg ácido gálico/100 g fruta (Jacques *et al.*, 2010). Esta variabilidade no conteúdo de fenóis pode estar relacionada à diferença de metodologias empregadas na extração da amostra para a determinação dos fenóis totais, pela diferença de safra, clima ou pela localização das plantas.



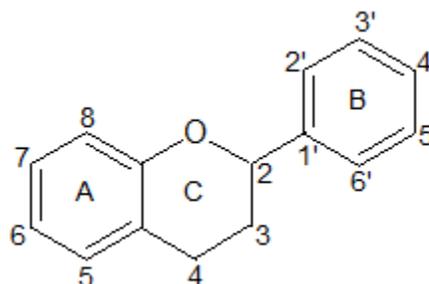
**Figura 3. 2** – Estruturas básicas de compostos fenólicos não flavonoides e flavonoides. Fontes: Bravo (1998) e Ignat, Volf e Popa (2011).

Dentre os compostos fenólicos com propriedades antioxidantes presentes na amora-preta destacam-se as antocianinas, sendo a cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo as mais representativas. Estão presentes também outros flavonoides como quercetina e kaempferol; flavonoides: catequina e epicatequina; ácidos hidroxicinâmicos: p-cumárico, caféico e ferúlico e os ácidos hidroxibenzóicos: p-hidroxibenzóico e ácido elágico, este último presente em quantidades mais significativas na forma de seu precursor, o ácido gálico (Siriwoharn *et al.*, 2004). A capacidade antioxidante da amora tem sido atribuída, em especial, aos flavonoides antociânicos, os quais têm demonstrado agirem como quelantes do oxigênio singlete e triplete, sequestrantes de radicais livres e inibidores enzimáticos (Sellappan, Akoh e Krewer, 2002).

### 3.2.1 Flavonoides

Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos de plantas, sendo responsáveis pela coloração das flores e dos frutos. São substâncias de baixo peso molecular, compostas de 15 átomos de carbono. A Figura 3.3 ilustra sua estrutura genérica formada, essencialmente, por dois anéis aromáticos, A e B, ligados por uma ponte de três carbonos e condensados por um oxigênio, usualmente na forma de anel heterocíclico.

Variações nas configurações de substituição anel C resultam na maioria das subclasses dos flavonoides (Francis, 1989; Balasundram, Sundram e Samman, 2006; Malacrida e Motta, 2006).



**Figura 3.3** – Estrutura genérica dos flavonoides. Fonte: Malacrida e Motta 2006.

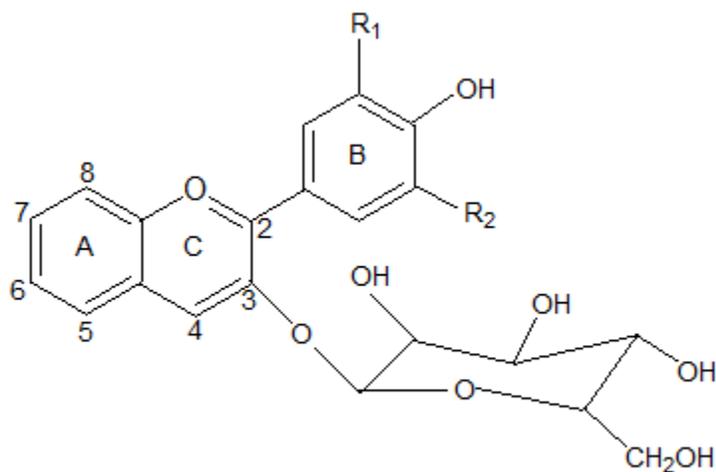
Seu potencial antioxidante é dependente do número e da posição dos grupos de hidrogênio e suas conjugações, e também devido à presença de elétrons nos anéis benzênicos e dos grupamentos hidroxila, metoxi e glicosídico. Em geral, a presença de grupos hidroxila nas posições 3, 4 e 5 do anel B tem sido descrita como responsável por aumentar a atividade antioxidante; no entanto, dependendo da subclasse de flavonoide, o efeito pode ser contrário (Francis, 2000; Balasundram, Sundram e Samman, 2006).

### 3.2.1.1 Antocianinas

As antocianinas são flavonoides que se encontram largamente distribuídos na natureza e são pigmentos vegetais responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e quase todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, como a amora-preta, algumas folhas, caules e raízes de plantas. São compostos solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas (Malacrida e Motta, 2006). A Figura 3.4 exemplifica a estrutura básica de uma molécula de antocianina.

A molécula de antocianina (Figura 3.4) é constituída por duas ou três porções, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos (Francis, 1989). Aproximadamente 22 agliconas são conhecidas, das quais 18

ocorrem naturalmente e apenas seis (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) são importantes em alimentos (Francis, 2000).



Aglicona (Estrutura do anel B)	Substituição glicosídica (substituição nas posições 3 e 5)	Acilação (esterificação das hidroxilas do açúcar)
R1 = R2 = H	D-glicose	Ácidos cinâmicos
R1 = OH, R2 = H	D-galactose	p-cumárico
R1 = R2 = OH	D-xilose	Ferúlico
R1 = OCH3, R2 = H	L-ramnose	Caféico
R1 = OCH3, R2 = OH	L-arabinose	
R1 = R2 = OCH3	Rutnose	Ácidos alifáticos
	Soforose	Acético
	Sambubiose	Malônico
	Gentiobiose	Succunico

**Figura 3. 4** – Estrutura química das principais antocianinas encontradas na natureza. Fonte: Malacrida e Motta (2006).

Antocianidinas livres são raramente encontradas em plantas, ocorrendo comumente glicosiladas com açúcares que estabilizam a molécula (Francis, 2000). A glicosilação pode ocorrer em várias posições, sendo observada com maior frequência na posição 3. O segundo açúcar quando presente na molécula encontra-se na posição 5, porém podem ocorrer glicosilações nas posições 7, 3', 4' e 5' (Brouillard e Dubois, 1977). Glicose, raminose, xilose, galactose, arabinose e frutose são os açúcares mais comumente ligados às antocianidinas, ocorrendo como monoglicosídeos, diglicosídeos e triglicosídeos glicosilados diretamente na aglicona. Os glicosídeos presentes nas moléculas de antocianinas aumentam sua solubilidade e estabilidade quando comparadas com as antocianidinas (Francis, 1989; He e Giusti, 2010).

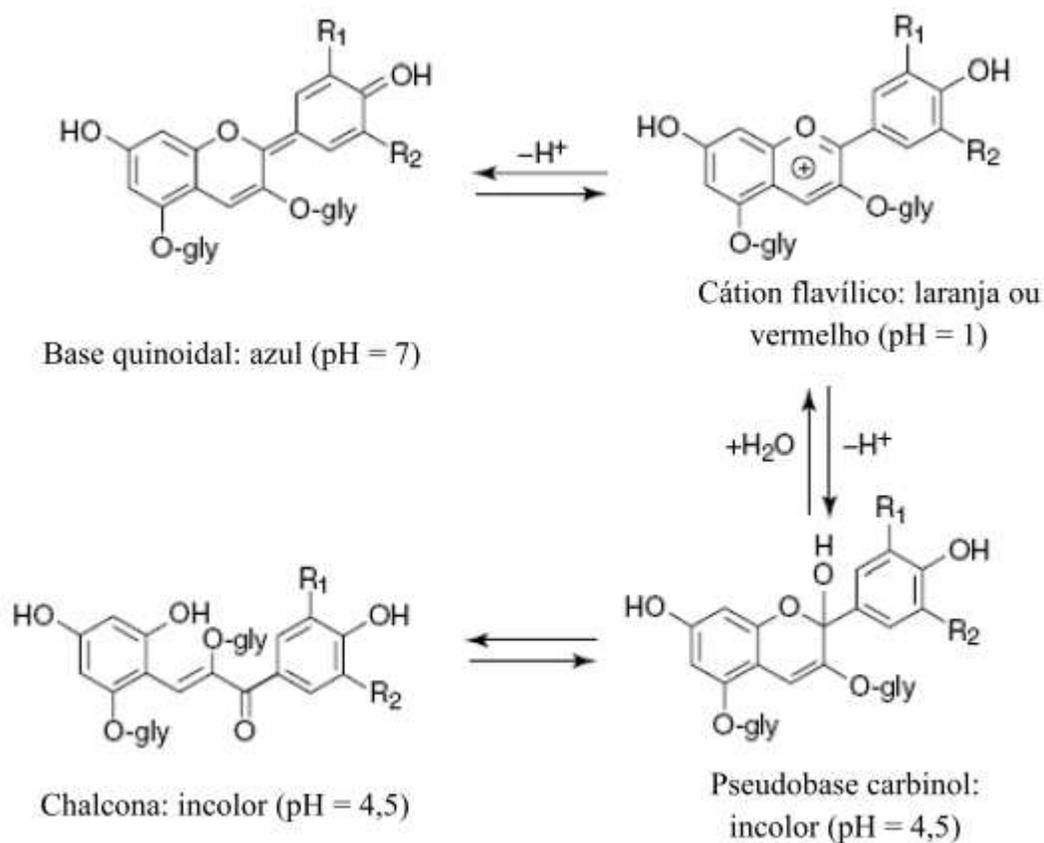
Muitas vezes, os açúcares das antocianinas são acilados pelos ácidos p-cumárico, ferúlico, cafêico, p-hidroxibenzóico, sinápico, malônico, acético, succínico, oxálico e málico (Francis, 1989; He e Giusti, 2010). Os substituintes acila encontram-se usualmente ligados à hidroxila do açúcar na posição 3 e com menor frequência nas posições 4 e 6. A metoxilação é mais frequente nas posições 3' e 5' e menos comum na 5 e na 7. É importante salientar que antocianina natural nunca apresenta as hidroxilas das posições 5, 7 e 4' substituídas ao mesmo tempo. Um dos grupos hidroxila deve permanecer livre numa dessas posições para a formação da estrutura quinoidal, responsável pela cor (Brouillard e Dubois, 1977)

As antocianinas compõe a única subclasse dos flavonoides que sofrem transformações estruturais reversíveis em solução com a mudança de pH do meio (Figura 3.5). O pH exerce profunda influência na cor das antocianinas, assim como na sua estabilidade. As antocianinas são mais estáveis em soluções ácidas do que em neutras e alcalinas (Jackman *et al.*, 1987). Em solução aquosa, segundo Brouillard e Dubois (1977), podem existir quatro formas estruturais de antocianinas em equilíbrio (Figura 3.5): o cátion flavílico ( $AH^+$ ), a base quinoidal (A), a pseudobase ou carbinol (B) e a chalcona (C). Em condições ácidas (pH inferior a 3), a antocianina existe primariamente na forma de cátion flavílico ( $AH^+$ ) de cor vermelha. Elevando-se o pH ocorre a rápida perda do próton para produzir as formas quinoidais (A), azuis ou violetas. Em paralelo ocorre a hidratação do cátion flavílico ( $AH^+$ ), gerando a pseudobase incolor ou carbinol (B) que atinge o equilíbrio lentamente com a chalcona incolor (C). As quantidades relativas de cátion ( $AH^+$ ), formas quinoidais (A), pseudobase (B) e chalcona (C) na condição de equilíbrio variam conforme o pH e a estrutura da antocianina (Jackman *et al.*, 1987; Routray e Orsat, 2011).

As antocianinas são rapidamente destruídas pelo aquecimento durante o processamento e estocagem de alimentos. Muitos estudos demonstraram relação logarítmica entre a destruição das antocianinas e o aumento aritmético da temperatura. Processos utilizando baixo tempo em alta temperatura têm sido recomendados para melhor retenção dos pigmentos (Patras *et al.*, 2010).

O mecanismo da degradação térmica das antocianinas ainda não foi completamente elucidado. Adams e Ongley (1973) mostrou que para valores de pH entre 2,0 e 4,0, o aquecimento das antocianinas provoca primeiramente a hidrólise da ligação glicosídica

com posterior formação da chalcona. Além disso, existem evidências de que a hidrólise glicosídica das antocianinas seja a principal causa da perda de cor, uma vez que a velocidade da liberação do açúcar é proporcional à velocidade da perda da cor vermelha.



**Figura 3.5** – Transformações estruturais de antocianinas em meio aquoso em função do pH. Fonte: Adaptado de Jackman *et al.* (1987).

Outros fatores, além do pH e da temperatura, que podem comprometer a estabilidade das antocianinas incluem, oxigênio, enzimas, luz, acilação, copigmentação e íons metálicos o que dificulta sua aplicação como corante alimentício (Francis, 1989; Malacrida e Motta, 2006).

De forma geral, em amoras-pretas, o conteúdo de antocianinas totais monoméricas é da ordem de 70 – 200 mg de cianidina-3-glicosídeo/100 g de fruta fresca, sendo que esse número pode variar de acordo com a cultivar e fatores ambientais. Dentre as antocianinas

identificadas em amora-preta, incluem-se a cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-arabinosídeo, cianidina-3-galactosídeo, malvidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, cianidina-3-xilosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, cianidina-malonoil-glicosídeo, cianidina-dioxaloil-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e malvidina-acetilglicosídeo. Em termos quantitativos, 80% do total das antocianinas são na forma de cianidina-3-glicosídeo (Serraino *et al.*, 2003; Seeram *et al.*, 2006; Jacques e Zambiasi, 2011; Kaume, Howard e Devareddy, 2011).

A amora-preta e outras frutas apresentam antocianinas monoméricas, responsáveis pela pigmentação de cor vermelha, e poliméricas, que apresentam a coloração marrom. O conteúdo de antocianinas poliméricas é menor em frutas e vegetais frescos (em torno de 10 %); em alimentos provenientes destes produtos, esse teor é maior (30 %). Este aumento, devido às condições de processamento e armazenamento, pode acabar afetando as propriedades funcionais destes produtos, como atividade antioxidante, aroma, sabor e coloração, tornando-a menos intensa e mais escurecida. As reações responsáveis por essas transformações incluem, frequentemente, a condensação direta entre antocianinas e flavonóis e a polimerização das próprias antocianinas (Malacrida e Motta, 2005).

Apesar de largamente disseminadas na natureza, são poucas as fontes comercialmente utilizáveis para se extrair antocianinas e outros compostos que possuam poder colorante ou características bioativas. Entre essas, pode-se citar os resíduos gerados nos processamentos de frutas vermelhas. Isso evidencia a importância da reutilização do bagaço dessas frutas para o fim de extração de fitoquímicos (Malacrida e Motta, 2006).

### **3.3 BAGAÇO**

Vários subprodutos do processamento de alimentos, como cascas e bagaço, representam uma fonte abundante de compostos bioativos, incluindo os compostos fenólicos (Balasundram, Sundram e Samman, 2006; Ignat, Volf e Popa, 2011). A concentração destes compostos vai depender do processo de fabricação e da variedade do fruto. Inúmeros fatores como cultivar, condições de cultivo, tempo de contato do resíduo com o produto, temperatura de processo e a presença de sementes, afetam a transferência de fenólicos e outros compostos bioativos para o produto principal, o que irá determinar a quantidade disponível de componentes fenólicos no bagaço (Moure *et al.*, 2001).

Em alguns casos estes subprodutos são reutilizados para adubação de solo ou na complementação de ração animal, mas a maior parte é desperdiçada, sendo dessa forma desviada para aterros. Devido à *European Landfill Directive*, a indústria de alimentos é forçada a reduzir a percentagem de resíduos e subprodutos destinados a aterros até 2020 (Abdille *et al.*, 2005; Kosseva, 2009; Wijngaard, Ballay e Brunton, 2012). Dessa forma, pesquisas referentes ao desenvolvimento de novas tecnologias de extração ou otimização das mesmas são de grande interesse para esse tipo de indústria, já que é uma maneira de conseguir tal redução.

A amora-preta, bem como outras pequenas frutas vermelhas (mirtilo, framboesa, morango e cereja), tem sido utilizada pela indústria, tanto *in natura* como processado, para a fabricação de sucos e derivados (geleias, iogurtes, sorvetes). Entretanto, estes processamentos geram em torno de 20 % de resíduo sólido (bagaço) que é composto basicamente de cascas e sementes e é rico em compostos fenólicos (em destaque os compostos antociânicos). Como relatado em várias pesquisas, o teor de polifenóis presente no bagaço (principalmente na casca) proveniente de sucos e derivados é da ordem de 68 % do conteúdo total de compostos fenólicos presentes no fruto (Pertuzatti, 2009; Khanal, Howard e Prior, 2010; Souza *et al.*, 2010; Zen, 2010; Kechinski, 2011). Isto se deve à ação fitoprotetora destes compostos, protegendo os frutos contra fitopatógenos e outras fontes de estresse como ferimentos, radiação solar intensa e baixas temperaturas, resultando em uma maior atividade antioxidante da casca destes frutos (Fachinello, 2008; Pertuzatti, 2009).

Após o processamento, há dúvidas quanto à manutenção dos fitoquímicos encontrados nas frutas *in natura*. Sabe-se que ocorre uma perda de compostos bioativos nos processos de fabricação em relação aos valores encontrados inicialmente, e esta perda continua durante o armazenamento através do tempo, mas, mesmo assim, o resíduo produzido ainda é considerado uma boa fonte de fitoquímicos antioxidantes (Mota, 2006).

Nas cascas de vários frutos foram encontrados maiores quantidades de compostos fenólicos que nas partes carnudas comestíveis. Por exemplo, as cascas das maçãs, tomates, uvas, romãs, pêssegos e pêras encontraram-se o dobro da quantidade de fenólicos totais do que na polpa (Balasundram, Sundram e Samman, 2006).

O crescente interesse na extração de antocianinas do bagaço das frutas vermelhas surgiu devido a suas inúmeras propriedades que beneficiam a saúde (redução do estresse

oxidativo, propriedade de eliminar radicais livres, auxiliando na redução do risco de câncer e doenças, bem como a regulação do colesterol). Além disso, extratos contendo antocianinas têm potencial como corantes naturais e a ser utilizado na produção de medicamentos (Fachinello, 2008).

De acordo com Vatai, Škerget e Knez (2009), do ponto de vista econômico, as melhores fontes para obtenção de compostos fenólicos para comercialização são os resíduos industriais de materiais vegetais com alta disponibilidade desses compostos.

Compostos bioativos vêm sendo extraídos a partir de bagaço de uva, jabuticaba, batata, maçãs, mirtilo, dentre outros vegetais, usando uma combinação de solventes como ácidos, água, metanol, acetona e clorofórmio, alguns dos quais são tóxicos, caros e perigosos para o ambiente e para a saúde humana. Além disso, compostos fitoquímicos extraídos deve ser submetidos à desintoxicação antes da incorporação em produtos alimentares por filtragem e concentração dos extratos por evaporação sob vácuo (Fachinello, 2008). No entanto, métodos clássicos de extração consomem muito solventes e tempo e podem promover a degradação dos compostos de interesse durante o processo de extração.

A utilização da técnica de extração de líquido pressurizado (PLE) é uma alternativa atraente, porque permite a extração rápida e reduz o consumo de solvente. A PLE tem sido utilizada com sucesso para a extração de compostos fitoquímicos termolábeis de vários vegetais (Luthria, 2008; Monrad *et al.*, 2010; Santos, Veggi e Meireles, 2012).

### **3.4 EXTRAÇÃO**

A extração é uma operação unitária que tem por objetivo separar determinadas substâncias a partir de suas matrizes, sólidas, semi-sólidas ou líquidas, através de processos químicos, físicos ou mecânicos.

O processo de extração possui várias aplicações na área de engenharia química, de alimentos e farmacêutica. É utilizada na remoção de contaminantes ou compostos indesejáveis em alimentos e amostras biológicas como colesterol, alcaloides, pesticidas, metais, toxinas naturais e compostos policlorados, e na recuperação de fitoquímicos de interesse também em alimentos e/ou matrizes orgânicos como polifenóis, compostos

farmacologicamente ativos, óleos essenciais, corantes, esteroides e aromatizantes (Carabias-Martínez *et al.*, 2005).

A técnica de extração empregada na obtenção de extratos de produtos naturais influencia diretamente sua qualidade e sua composição final. O procedimento de extração é determinado pela família de compostos a ser extraída e se o objetivo é quantitativo ou qualitativo. O rendimento e a composição dos extratos dependem tanto do solvente utilizado como do método aplicado, que pode ser baseado em mecanismos químicos diferentes, pois a solubilidade de substâncias se dá em função de uma afinidade química existente entre as espécies do sistema, função de sua polaridade, ou seja, diferentes substâncias serão extraídas de acordo com seu grau de polaridade e do solvente utilizado. Quando o objetivo é obter corantes ou produtos antioxidantes para a indústria de alimentos, as extrações geralmente são realizadas utilizando água, álcoois ou uma mistura deles, como é o caso dos flavonoides por serem compostos polares. Na maioria dos casos, a temperatura de extração e a natureza do solvente determinam o poder de dissolução do soluto (Oliveira, 2010).

A extração de compostos de fontes naturais é realizada por técnicas tradicionais como: extração em aparelho Soxhlet, maceração, sonicação e extração sólido-líquido. No entanto, estas técnicas são ineficientes, devido aos baixos rendimentos de extração, requerem longo tempo de extração, e podem consumir grandes quantidades de amostras e solventes orgânicos, dos quais os últimos são muitas vezes dispendiosos de se adquirir, além do seu impacto negativo sob o meio ambiente e serem nocivos à saúde humana. Uma das principais desvantagens dos métodos tradicionais de extração está no fato de, muitas vezes, os extratos obtidos necessitarem de subsequente concentração e purificação antes da análise e do consumo. Além disso, ao se considerar a extração de compostos bioativos que são sensíveis, termolábeis e que são encontrados em baixas concentrações, as técnicas de extração tradicionais não seriam a opção mais adequada. Na tentativa de superar estas limitações, nos últimos anos diversas outras técnicas de extração têm sido desenvolvidas. Entre elas, a extração assistida por microondas (MAE), extração com fluido supercrítico (SFE) e a extração com líquido pressurizado (PLE), as quais estão recentemente em estudo intensivo, uma vez que estão sendo relatadas inúmeras vantagens sobre os processos tradicionais, tais como boa eficiência, utilização de solventes não poluentes e seguros e

flexibilidade no processo devido à seletividade do solvente (Camel, 2001; Ramos, Kristenson e Brinkman, 2002; Carabias-Martínez *et al.*, 2005; Mustafa e Turner, 2011; Wijngaard *et al.*, 2012).

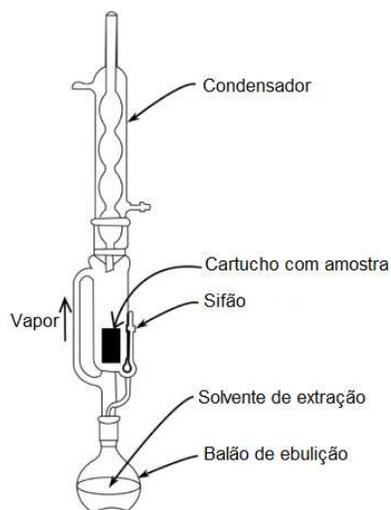
### 3.4.1 Métodos Clássicos de Extração

#### 3.4.1.1 Extração Soxhlet

A extração Soxhlet foi originalmente desenvolvida para determinação de gordura em leite. É, hoje, um dos métodos mais utilizados em escala laboratorial para extração de matrizes sólidas. De fato, por quase um século essa técnica foi o modelo a ser seguido e permanece como a referência com a qual novos métodos são comparados (Castro e García-Ayuso, 1998).

Esse processo de extração é um método contínuo, considerado um caso particular da lixiviação em que a matéria-prima é extraída através do solvente aquecido em refluxo contínuo. A forma do equipamento (Figura 3.6) faz com que o solvente presente em um balão, aquecido até o seu ponto de ebulição, ascenda na forma de vapor até um condensador e desça liquefeito até o extrator onde entra em contato com a amostra. O solvente permanece em contato com a amostra até que atinja um determinado nível, no qual um sifão faz com que o solvente retorne para o balão, já com o extrato. Esse procedimento se repete até completa extração da matéria-prima. O solvente extrai o material orgânico retido na amostra à temperatura próxima à ambiente, mas o material extraído permanece em contato com o solvente em ebulição durante todo o procedimento o que pode provocar transformações químicas nos componentes extraídos (Castro e García-Ayuso, 1998; Castro e Priego-Capote, 2010).

O processo, em geral, produz altos rendimentos por fazer com que o solvente em contato com a amostra seja sempre renovado (já que o extrato permanece no balão). Ainda que seja um método muito utilizado na extração de compostos orgânicos, ele apresenta restrições ligadas à baixa seletividade e ao elevado tempo de extração, que pode variar de 1 a 72 horas. Prolongados tempos de extração aumentam a chance de oxidação dos fenólicos (Castro e Priego-Capote, 2010).



**Figura 3. 6** – Extrator Soxhlet.

Ainda assim, a extração Soxhlet é bastante utilizada em laboratório para comparação com outros métodos de extração devido a vantagens como renovação do solvente durante o processo, o que aumenta a eficiência da extração; dispensa filtração, o que simplifica o tempo de manuseio do extrato após a extração e os riscos de perda e/ou contaminação do extrato, além de apresentar boa reprodutibilidade (Castro e García-Ayuso, 1998; Castro e Priego-Capote, 2010).

#### **3.4.1.2 Extração por Maceração**

É a operação na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e com ou sem renovação do líquido extrator. Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula (Melecchi, 2005).

É um processo não seletivo, e que é influenciado por fatores que dependem da matéria-prima (sua natureza, tamanho de partícula, grau de umidade e quantidade em peso), e do solvente (sua seletividade e quantidade em volume). A velocidade com que se obtém

o equilíbrio é função do tamanho de partícula e do grau de inchamento das células, bem como da viscosidade e da polaridade do solvente (Melecchi, 2005).

Este processo fica restrito quando se trabalha com substâncias ativas pouco solúveis, plantas com elevado índice de intumescimento e possíveis proliferações microbianas. Apesar dos inconvenientes apresentados, ainda é uma das técnicas extrativas mais usuais devido à simplicidade e custos reduzidos (Melecchi, 2005).

### 3.4.2 Extração com Líquido Pressurizado (PLE)

A extração com líquido pressurizado (PLE - *pressurized liquid extraction*) é uma técnica que envolve a extração com solventes líquidos em temperaturas acima do seu ponto de ebulição e abaixo do seu ponto crítico, sob altas pressões, visando aumentar a eficiência e a rapidez do processo quando comparado com as técnicas realizadas próximas à temperatura ambiente e pressão atmosférica (Camel, 2001; Pronyk e Mazza, 2009). Todos os solventes podem, potencialmente, ser usados na PLE, exceto quando eles atingem seu ponto de auto-ignição.

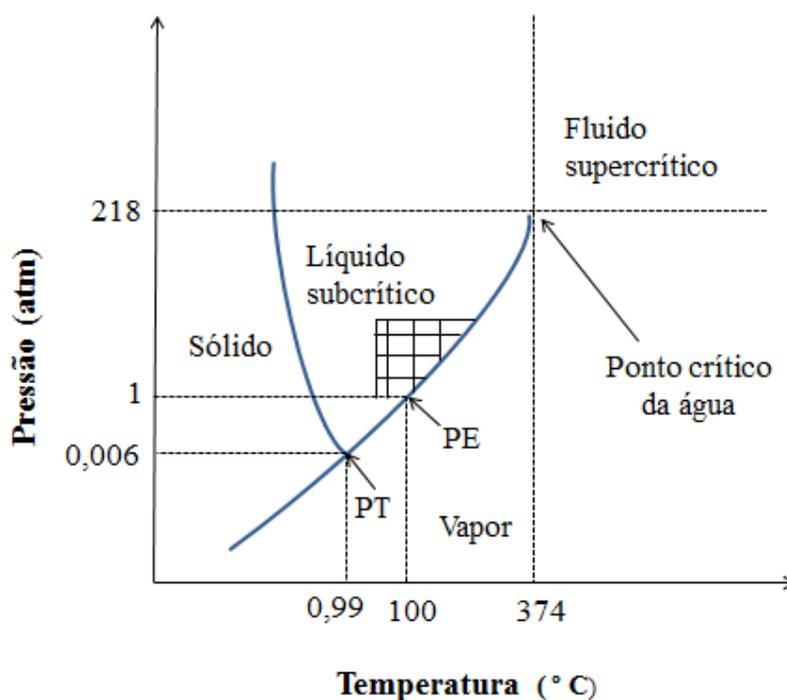
Extrações realizadas em temperaturas elevadas podem ser vantajosas devido a alterações na transferência de massa e no equilíbrio da superfície. Temperaturas elevadas de extração fazem aumentar a taxa de transferência de massa e taxas de extração, já que geralmente implicam em: i) um aumento da capacidade dos solventes solubilizarem os solutos, ii) um aumento da taxa de difusão, iii) uma maior ruptura das ligações entre os analitos e a matriz e conseqüente melhora na aceleração da cinética de dessorção, iv) uma diminuição da viscosidade do solvente e v) diminuição da tensão superficial do solvente, fazendo com que haja maior penetração do solvente nos poros da matriz (Ramos, Kristenson e Brinkman, 2002; Pronyk e Mazza, 2009; Wijngaard *et al.*, 2012).

A elevada pressão aplicada, geralmente variando de 4 a 20 MPa, garante que o solvente se mantenha no estado líquido na temperatura de processo (Ramos, Kristenson e Brinkman, 2002). Esta é a principal razão para a utilização de pressão alta. De acordo com o relato de alguns autores, os efeitos da pressão parecem contribuir muito pouco, chegando a ser insignificantes, nas propriedades do solvente, e, portanto, os pesquisadores geralmente aplicam uma pressão constante nos experimentos que empregam a técnica PLE. A baixa contribuição da pressão se deve ao fato do fluido empregado na técnica PLE ser um líquido,

e na maioria dos casos substâncias neste estado de agregação são incompressíveis (Ramos, Kristenson e Brinkman, 2002; Mustafa e Turner, 2011). De facto, em elevadas temperaturas e pressões, o solvente pode ser considerado como estando em um estado subcrítico (Camel, 2001). A Figura 3.7 apresenta um diagrama de fases da água pura, em função da temperatura e pressão, mostrando a região do estado subcrítico. A área hachurada (Figura 3.7) indica a região preferida para se realizar a extração com água no estado líquido subcrítico (King e Grabiél, 2007; Wijngaard *et al.*, 2012)

A PLE geralmente requer menos tempo (tempo de extração varia entre 5 a 30 minutos) e menor consumo de solventes que as técnicas convencionais (Mendiola *et al.*, 2007). Esta é a razão pela qual a PLE pode ser de interesse comercial, como um método de extração alternativa para a obtenção de compostos bioativos a partir de subprodutos.

A fim de recuperar compostos naturais de resíduos oriundos da indústria de alimentos, tal como do bagaço da amora-preta, solventes GRAS - *Generally Recognized as Safe* - (como etanol e água) são os mais recomendados para serem utilizados na extração.

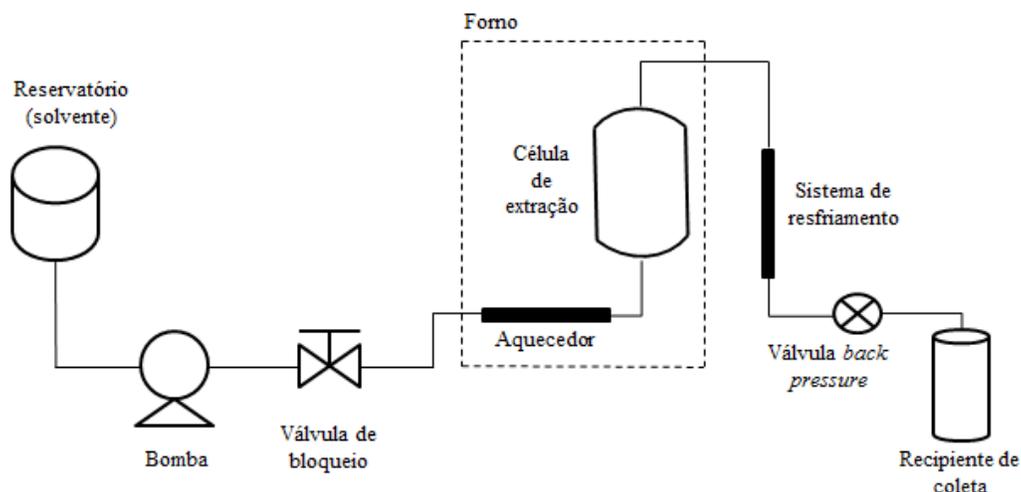


**Figura 3. 7** – Diagrama de fase da água pura. PT e PE representam o ponto triplo e o ponto de ebulição da água pura, respectivamente. Fonte: Adaptado de King e Grabiél (2007).

A técnica PLE é também conhecida como extração com fluido pressurizado (PFE), extração com solvente subcrítico (Kosseva), extração acelerada com solvente (ASE), extração com solvente quente pressurizado (PHSE) e extração com solvente a alta pressão (HPSE). Quando 100% de água (solvente ambientalmente amigável) é utilizada como solvente, a PLE é geralmente denotada pelos seguintes termos: extração com água subcrítica (SWE), extração com água quente pressurizada (PHWE), extração com água pressurizada a baixa polaridade, extração com água superaquecida e ainda pode ser encontrado na literatura extração com água líquida quente ou extração com água a alta temperatura (Carabias-Martínez *et al.*, 2005; Pronyk e Mazza, 2009; Mustafa e Turner, 2011).

Como a SWE é um caso particular da PLE, a unidade de ambos os sistemas é similar (Figura 3.8). Um sistema básico de extração utilizando líquido pressurizado consiste de um reservatório para conter o solvente, uma bomba, uma válvula de bloqueio, uma célula de extração, uma válvula reguladora de pressão e um frasco para a coleta dos extratos. A célula extratora geralmente é construída dentro de um forno de temperatura controlada. Em várias unidades adiciona-se uma bobina antes do extrator para o pré-aquecimento do solvente e um sistema de resfriamento após o mesmo para que o extrato atinja a temperatura ambiente (Camel, 2001; Ramos, Kristenson e Brinkman, 2002; Khuwijitjaru *et al.*, 2004; García-Marino *et al.*, 2006; Lamoolphak *et al.*, 2006; Wiboonsirikul e Adachi, 2008; Pronyk e Mazza, 2009). Depois de encher a célula de extração com a amostra e colocá-la no forno, o experimento inicia-se com o bombeamento do solvente, na vazão selecionada. A extração propriamente dita apenas começa quando o sistema atinge a temperatura e a pressão selecionadas para os experimentos de PLE (Ramos, Kristenson e Brinkman, 2002). Além disso, antes do tratamento com solvente subcrítico, o pré-tratamento das amostras pode ser necessário, como, por exemplo, secagem ao ar ou liofilização. Em seguida, a amostra seca deve ser moída para se obter um tamanho menor e mais homogêneo. O pré-tratamento da amostra facilita o transporte de soluto para a superfície das partículas (Wiboonsirikul e Adachi, 2008). Entretanto, a extração de amostras úmidas utilizando a água como solvente de extração geralmente permite a eliminação da etapa de secagem ou liofilização, o que faz minimizar o pré-tratamento das

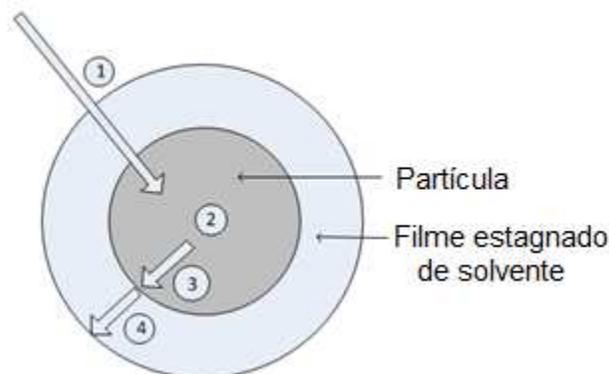
mesmas, evidenciando assim mais uma vantagem de se utilizar esta técnica frente a outros métodos de extração.



**Figura 3. 8** – Diagrama esquemático de uma unidade extratora típica utilizando solvente pressurizado. Fonte: Adaptado de García-Marino *et al.* (2006).

Segundo Lou, Janssen e Cramers (1997), o mecanismo de extração de substâncias bioativas a partir de produtos agrícolas utilizando água subcrítica envolve, principalmente, quatro etapas consecutivas: absorção do solvente, a dessorção/solvatação, a difusão e a dissolução (Figura 3.9). Primeiramente, a matriz vegetal absorve o solvente subcrítico, inchando a estrutura das células, as membranas celulares e os canais intercelulares são dilatados, fazendo com que a resistência à transferência de massa diminua. Em paralelo a isto, ocorre a dissolução/dessorção dos compostos do extrato que podem ser extraídos pelo solvente. Em seguida, tem-se a transferência por difusão dos compostos solubilizados de dentro do sólido até a sua superfície. Os compostos solubilizados atingem a superfície externa e finalmente são transportados da superfície para o seio do solvente subcrítico e são, subsequentemente, removidos com o solvente.

Para poder caracterizar e compreender melhor o processo de extração de compostos a partir de matrizes orgânicas, tais como do bagaço da amora-preta, é preciso compreender os mecanismos fenomenológicos presentes no processo. Desta forma o estudo da cinética de extração (curvas globais de extração) possibilita a aquisição destes conhecimentos.

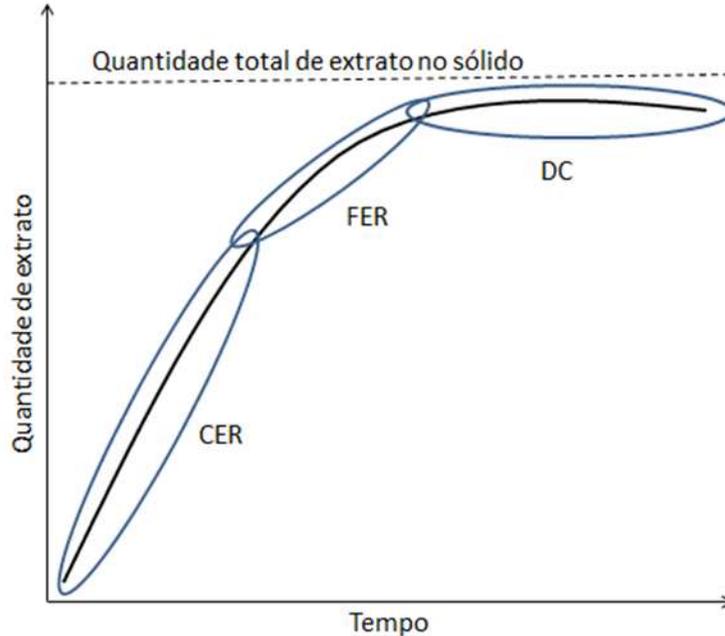


**Figura 3.9** – Representação das etapas do mecanismo de extração.

### 3.4.3 Cinética de Extração – Curvas Globais de Extração (OEC)

Para o dimensionamento industrial de uma unidade de extração com líquido pressurizado, é necessário o conhecimento dos parâmetros cinéticos do processo. A análise de um processo de extração utilizando este tipo de fluido pode ser feita considerando a curva global de extração.

A curva global de extração, também conhecida como *overall extraction curve* (OEC), é construída através da quantificação da massa de extrato ou rendimento global, em função do tempo ou da quantidade de solvente consumido (Brunner, 1994). O rendimento global é a quantidade total de material que pode ser extraído de uma matriz em determinada condição de temperatura e pressão, expresso como a razão entre a massa de extrato e a massa de matéria-prima (Vasconcellos, 2007). De acordo com a literatura as OEC's podem ser descritas por três etapas, ilustradas na Figura 3.10.



**Figura 3. 10** – Curva da cinética de extração do processo de extração com suas etapas: taxa de extração constante (CER); taxa de extração decrescente (FER); período difusional (DC). Fonte: Adaptado de Martínez (2005).

a) Etapa de taxa de extração constante (CER – *constant extraction rate*): caracterizado pela extração do soluto de acesso fácil que recobre a superfície externa das partículas ou daqueles liberados pelo rompimento das paredes celulares no pré-tratamento (moagem, por exemplo). A transferência de massa por convecção (escoamento do solvente) predomina. Esta etapa é caracterizada pelos parâmetros cinéticos: taxa de transferência de massa ( $M_{CER}$ ), duração do período CER ( $t_{CER}$ ), rendimento durante o período CER ( $R_{CER}$ ) e razão mássica de soluto na fase fluida na saída do extrator ( $Y_{CER}$ );

b) Etapa de taxa de extração decrescente (FER – *falling extraction rate*): período em que a camada de extrato facilmente acessível na superfície das partículas está se esgotando, uma vez que nem todas as partículas encontram-se revestidas pelo soluto ou a quantidade de células rompidas não é mais uniforme. A taxa de transferência de massa decresce rapidamente como resultado da diminuição da área efetiva de transferência de massa e passa a ser significativo o processo de transferência de massa por difusão. Nessa fase de transição, a resistência à transferência de massa encontra-se concomitantemente na fase sólida e na fase líquida e tanto a convecção quanto a difusão são importantes na extração;

c) Etapa difusional (DC – *diffusion controlled*): período caracterizado pela retirada do extrato através do mecanismo de difusão. Nesta etapa não há soluto na superfície da partícula sólida.

De acordo com Brunner (1994), a forma da OEC depende dos parâmetros de processo e dos fenômenos que ocorrem no leito fixo durante a extração. Devido à influência de vários fatores no resultado dessa curva, seu uso para comparação de extrações de diferentes materiais e de diferentes equipamentos é limitado, mas as informações que ela pode fornecer são úteis para comparar uma série de experimentos com o mesmo substrato e o mesmo equipamento.

#### **3.4.4 Aplicações dos Extratos de Frutas Vermelhas**

Existe uma grande demanda de pesquisa para desenvolver corantes alimentícios a partir de fontes naturais, para diminuir (ou eliminar), gradativamente, a dependência do uso de corantes alimentícios sintéticos no processamento de alimentos. As antocianinas são estudadas em todo o mundo como agentes de coloração em alimentos, pois elas são as responsáveis pelos tons de vermelho e azul de muitas frutas e vegetais, e consequentemente, provêm à cor atrativa de muitos sucos, vinhos, geleias e conservas. O consumo de antocianinas como corantes alimentícios traz benefícios para a saúde humana, associados à ingestão destas substâncias (Francis, 1989).

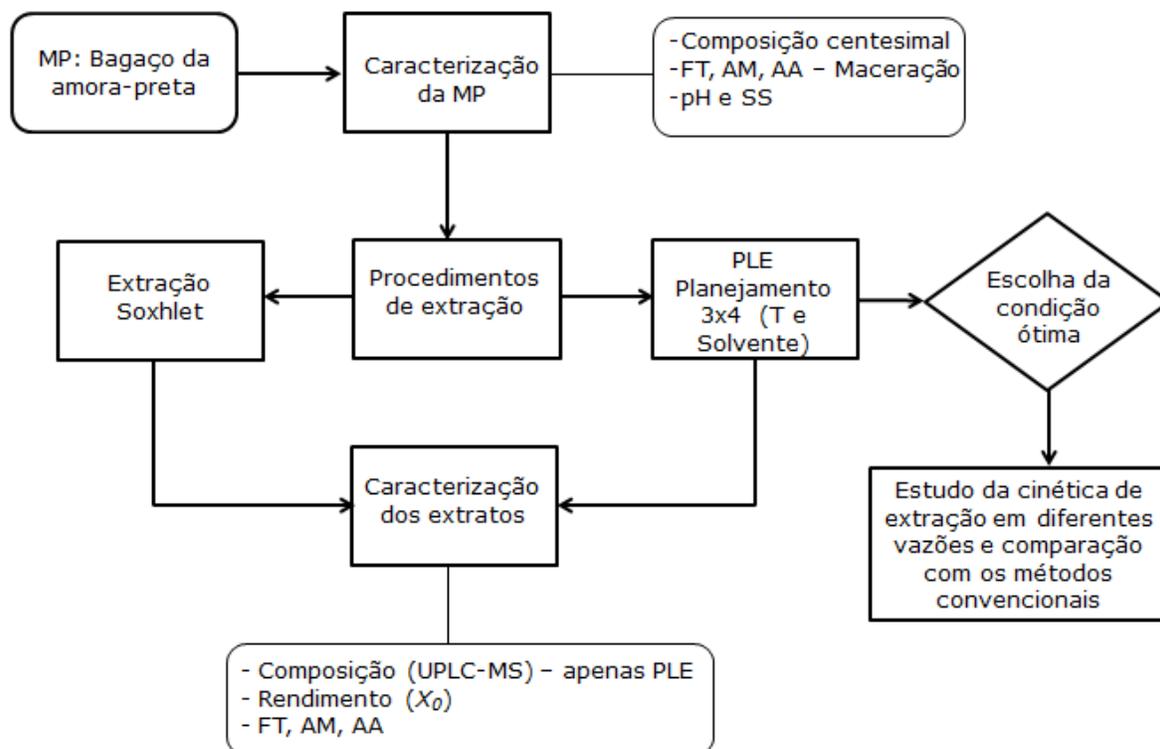
Existem aproximadamente 400 antocianinas diferentes catalogadas. Contudo, é como corante natural que as antocianinas encontram sua maior aplicação podendo atuar como agentes coloríficos em produtos alimentícios, cosméticos, fármacos, tecidos, tintas, dentre outros. Também, após sua purificação, estas podem ser apresentadas na forma medicinal (cápsulas, comprimidos, pó,...) e vendidos como nutracêuticos. Além disso, os antioxidantes naturais (antocianinas e outros polifenóis) a partir de fontes residuais podem ser usados para aumentar a vida de prateleira de alimentos, prevenindo a peroxidação de lipídeos e proteger contra danos oxidativos. O aumento da estabilidade à oxidação de óleos vegetais é importante para a prática industrial, e muitos ensaios antioxidantes são baseados nesta capacidade para retardar ou inibir a rancificação (Francis, 1989).

A cor desempenha um papel importantíssimo na percepção da qualidade indicando as nossas expectativas, susceptibilidades e preferências por produtos podendo ser utilizada para inspeção de qualidade, auxiliar no marketing e satisfazer consumidores. A cor dos produtos industrializados pode ser o resultado da presença de pigmentos naturais na matriz utilizada; devido à coloração formada durante o processamento ou armazenamento; ou ainda devido à adição de corantes naturais ou sintéticos. Corantes ou aditivos de cor são os termos associados a todos os agentes coloríficos solúveis ou solubilizados (tintas ou pigmentos), bem como os pigmentos insolúveis, empregados para dar cor a um material. A principal função da adição de corantes em produtos alimentícios é proporcionar a melhoria na aparência dos mesmos, deixando-os mais parecidos aos produtos naturais e mais agradáveis, portanto, aos olhos do consumidor, que, desta forma, é estimulado a consumir o produto, já que a aparência tem um papel importantíssimo na aceitação desses produtos (Cavalcanti, 2013).

Portanto, as antocianinas representam uma importante alternativa como corantes, principalmente, corantes vermelhos os quais são os corantes naturais mais difíceis de encontrar na natureza em sua forma estável (Cavalcanti, 2013).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

A maior parte deste trabalho foi desenvolvida no LAPEA (Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos – DEA/FEA/UNICAMP). A Figura 4.1 apresenta o diagrama de fluxo das atividades realizadas, sendo estas detalhadas nas seções a seguir.



**Figura 4.1** – Diagrama de fluxo das atividades experimentais desenvolvidas neste trabalho.

### 4.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados na realização do experimento foram: éter de petróleo (Quemis<sup>®</sup>, Brasil, Lote 36128), álcool metílico P.A. (Êxodo Científica, Brasil, Lote: AM9113RA), Folin-Ciocalteu (Dinâmica<sup>®</sup>, Brasil, Lote: 57938), 1,1-difenil-2-picrilhidrazila - DPPH (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA, Lote: STBC1252V), álcool etílico P.A. (Êxodo Científica, Brasil, Lote: AE5761RA), 2,2'-azinobis(3-etil-benzotiazolona)-6-sulfônico - ABTS (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA, Lote:040M1142), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-ácido carboxílico - Trolox (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA, Lote:18396AK),

ácido clorídrico (Synth<sup>®</sup>, Brasil, Lote: 46094), ácido cítrico P.A. (Synth<sup>®</sup>, Brasil, Lote: 44173), carbonato de sódio P.A. (Synth<sup>®</sup>, Brasil, Lote: 31894), hidróxido de sódio P.A. (Synth<sup>®</sup>, Brasil, Lote: 156238), ácido gálico monoidratado (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, China, Lote: MKBG2262V) e persulfato de potássio (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Brasil, Lote: MKBG58688V). Nos experimentos foram empregados água destilada e reagentes químicos de grau analítico ou cromatográfico.

## **4.2 EQUIPAMENTOS**

Os equipamentos utilizados durante a condução dos experimentos foram: estufa convencional (FANEM<sup>®</sup>, Mod. 320-SE, Brasil), mufla (QUIMIS<sup>®</sup>, Mod.318.D21, Brasil), refratômetro (Mod.RL3, Polonal), pHmêtro de bancada (QUIMIS<sup>®</sup>, Mod.Q400AS, Brasil), bomba HPLC (LabAlliance, USA), balança analítica (Bel engineering, USA), balança (CAHN, Mod.C-35, USA), manta de aquecimento elétrica (Fisalom, Mod.52, Brasil), freezer doméstico (Consul, Mod.CRB36, Brasil), banho termostático (Marconi<sup>®</sup>, Mod.MA-1846, Brasil), evaporador rotativo (Tecnal<sup>®</sup>, Mod.TE-211, Brasil), bomba a vácuo (Tecnal<sup>®</sup>, Mod.TE-058, Brasil), cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC<sup>®</sup> acoplado a um espectrômetro de massas (UPLC-QToF-MS) (Synapt G2, Waters Corp., Milford, MA, USA), cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC-DAD) Elite LaChrom (VWR Hitachi, Tóquio, Japão) e espectrofotômetro (Hach, Mod.DR/4000, USA), pipetas automáticas e vidrarias diversas.

## **4.3 MATÉRIA-PRIMA**

### **4.3.1 Origem**

O resíduo (Figura 4.2) do processamento da polpa da amora-preta, da variedade Caingangue, foi cedido pela empresa Sítio do Bello, que se localiza no interior do município de Paraibuna-SP. Imediatamente após o recebimento, as amostras foram identificadas e armazenadas em freezer doméstico em temperatura de -18 °C, até realização dos experimentos.



**Figura 4. 2** – Resíduo da polpa da amora-preta.

Não houve nenhum preparo e tratamento da matéria-prima antes da sua utilização, já que a extração de amostras úmidas realizada por fluidos no estado de agregação líquido, como a água, permite a eliminação da etapa de secagem ou liofilização. Essa é uma das vantagens de se empregar a PLE ao invés de outras técnicas de extração (Wiboonsirikul e Adachi, 2008). Além disso, aparentemente, a amostra se encontrava homogênea por isso não foi feito, por exemplo, o processo de moagem.

As matérias-primas foram adquiridas em grande quantidade (20 kg) para evitar variações referentes a lotes diferentes.

#### **4.3.2 Caracterização Química**

A matéria-prima *in natura* foi caracterizada através das análises de composição centesimal, sólidos solúveis totais (SS), pH, quantificação do teor de antocianinas monoméricas totais (AM), do teor de compostos fenólicos totais (FT) e pela análise da atividade antioxidante total (AA), de acordo com as metodologias apresentadas a seguir. Vale ressaltar que as estas últimas análises (AM, FT e AA) e de SS foram realizadas a partir do extrato obtido pelo método clássico de extração por maceração. Este método é sugerido por vários autores (Rodriguez-Saona e Wrolstad, 2001; Ghosh e Konishi, 2007; Vizzotto e Pereira, 2011; Bondre *et al.*, 2012) para fazer a quantificação dos fitoquímicos presentes em frutas vermelhas.

### 4.3.2.1 Análise da Composição Centesimal, SS e pH

Todas as análises referentes à composição centesimal, sólidos solúveis totais (SS) e pH do resíduo da amora-preta foram realizadas em triplicatas (resultados expressos pela média dos valores em %  $\pm$  desvio padrão) e de acordo com as metodologias descritas no Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005) (Lutz, 2005) para umidade, cinzas, gordura total, pH e SS, e de acordo com AOAC (1997) para proteínas.

A determinação de proteínas foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos (DCA/FEA/UNICAMP) e as outras no LAPEA/DEA/UNICAMP.

A Tabela 4.1 apresenta as análises e, de forma sucinta, os métodos utilizados.

**Tabela 4.1** – Análises e métodos utilizados na caracterização química do resíduo de amora-preta.

Análises	Métodos
Umidade	Gravimetria em estufa convencional (FANEM <sup>®</sup> , Mod. 320-SE, Brasil) a 105 °C até peso constante.
Cinzas	Gravimetria, mediante incineração da amostra em mufla (QUIMIS <sup>®</sup> , Mod.318.D21, Brasil) a 550 °C até obtenção de cinzas claras.
Gordura total	Extração direta em aparelho de Soxhlet utilizando éter de petróleo como solvente.
Proteínas	Método de micro-Kjeldahl, empregando 6,25 como fator de correção de nitrogênio/proteína para vegetais.
Carboidratos	Diferença entre a massa inicial da amostra (100g) e o total da massa de proteínas, de lipídios, de cinzas e umidade.
SS	Foi analisado realizando a leitura em refratômetro de Abbé (Mod.RL3, Polonal), à temperatura ambiente, expressos em ° Brix.
pH	Processo eletrométrico empregando potenciômetro (QUIMIS <sup>®</sup> , Mod.Q400AS, Brasil) que permite a determinação direta do pH (pHmetro).

A extração por maceração do bagaço da amora-preta foi realizada em triplicata, de acordo com a metodologia descrita por Rodriguez-Saona e Wrolstad (2001). Esse processo envolveu a imersão do material vegetal em levemente acidificado (0,01 % v/v HCl).

Primeiramente foi preparada a solução de metanol acidificada. Depois, pesou-se aproximadamente 12,0 g do resíduo em balança analítica (Bel Engineering, USA). O resíduo foi transferido para um cadinho de porcelana, onde em seguida adicionou-se 60 mL de metanol acidificado e, manualmente, começou-se a macerar o material a cada 2 horas com o auxílio de um pistilo. Quando visualmente se percebia que a solução metanólica estava com uma cor característica da matéria-prima (avermelhada), então esta era filtrada em filtro de porosidade Ø 17,0 e coletada num frasco âmbar de volume adequado para conter todo o extrato. Este procedimento (desde a adição de 60 mL de metanol acidificado) foi repetido 5 vezes, pois foi quando se observou a obtenção de um extrato levemente colorido. O filtrado foi transferido para um balão de fundo redondo que foi acoplado em um rota-evaporador (Tecnal<sup>®</sup>, Mod.TE-211, Brasil) sob vácuo (Tecnal<sup>®</sup>, Mod.TE-058, Brasil) em banho termostático a 40 °C (Marconi<sup>®</sup>, Mod.MA-1846, Brasil), onde o metanol foi evaporado. Por fim, o extrato aquoso remanescente da rota-evaporação foi diluído com água destilada acidificada (0,01 % v/v HCl) até um volume conhecido (200 mL). Os extratos foram posteriormente identificados e armazenados em congelador a -18°C, até a realização das análises FT, AM e AA.

#### ***4.3.2.2 Teor de Fenólicos Totais (FT)***

A determinação do conteúdo total de fenólicos presentes nos extratos do bagaço da amora-preta foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton e Rossi (1965), com algumas adequações para extratos vegetais sugeridas por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999). O princípio do método baseia-se em uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre redução quando reage com compostos fenólicos ou outras substâncias redutoras, na presença do catalisador cobre II, com formação de complexos de coloração azul que absorvem fortemente entre 750 e 765 nm.

Ácido gálico foi usado como padrão e uma solução metanólica de concentração 1,0 mg/mL foi diluída com metanol para se obter concentrações adequadas (0,01 – 0,08 mg/mL) para a construção de uma curva padrão. A reação de oxi-redução foi realizada em tubos de ensaio, sendo transferidos para estes 0,5 mL de extrato da amostra (devidamente diluídos com metanol) ou das soluções padrões de ácido gálico, às quais em seguida foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteau (diluição 1:10 com água destilada). Depois de 5 minutos foram adicionados 2,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 7,5 %. Os tubos foram agitados manualmente (30 segundos) e deixados em repouso ao abrigo da luz e em temperatura ambiente por 2 horas para que ocorresse a reação. A absorvância de cada uma das soluções foi medida no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 760 nm em um espectrofotômetro UV-vis (Hach, Mod.DR/4000, USA). Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG)/g de resíduo fresco (RF).

#### ***4.3.2.3 Teor de Antocianinas Monoméricas Totais (AM)***

A determinação do conteúdo de antocianinas monoméricas totais (AM) dos extratos foi efetuada em duplicata pelo método de pH diferencial, conforme descrito por Giusti e Wrolstad (2001).

Para a realização desse método, foi necessário preparar duas soluções tampão: cloreto de potássio pH 1,0 (0,025 M) e acetato de sódio pH 4,5 (0,40 M). O ajuste do pH das soluções foi realizado através da adição de ácido clorídrico e a medição do pH foi realizada utilizando pHmetro (QUIMIS<sup>®</sup>, Mod.Q400AS, Brasil). As soluções-tampões depois de preparadas foram identificadas e armazenadas em geladeira doméstica na temperatura em torno de 8 °C. Para serem utilizadas, as amostras foram retiradas da geladeira um tempo antes, para assim chegarem à temperatura ambiente.

Os extratos da amora-preta foram apropriadamente diluídos nestas duas soluções tampão de forma que as suas leituras, realizadas no espectrofotômetro UV-vis (Hach, Mod.DR/4000, USA) nos comprimentos de onda de 510 e 700 nm, estivessem inferiores a 1,000. As medidas de absorvância foram feitas após 25 minutos depois de terem feito as diluições. A concentração de pigmentos no extrato foi calculado considerando a

absortividade molar ( $\epsilon$ ) de 26900 L/cm.mol, massa molecular de 449,2 g/mol, que correspondem à cianidina-3-glicosídeo, principal antocianina presente na amora-preta (Siriwoharn *et al.*, 2004), e os resultados expressos como mg equivalente de cianidina-3-glicosídeo (EC3G)/g de resíduo fresco (RF), utilizando a Equação 4.1

$$AM \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{A \times MM \times FD \times 1000}{\epsilon \times l} \quad \text{Eq. (4.1)}$$

Onde:

AM = Antocianinas monoméricas totais;

$A = (Abs_{510 \text{ nm}} - Abs_{700 \text{ nm}})_{pH 1,0} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH 4,5}$

MM = massa molecular;

FD = fator de diluição;

$\epsilon$  = absortividade molar

l = fator de correção de caminho óptico de 1 cm.

#### **4.3.2.4 Atividade Antioxidante Total (AA)**

A atividade antioxidante total dos extratos foi determinada pelos métodos DPPH e ABTS, descritos a seguir.

- **Método DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazila)**

A determinação da atividade antioxidante total pelo método DPPH foi realizada seguindo a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2007b), com algumas adaptações. Este método se baseia em um ensaio fotométrico onde o radical livre DPPH<sup>\*</sup> (1,1-difenil-2-picrilhidrazila), que apresenta coloração roxa intensa em solução alcoólica, se reduz em presença de moléculas antioxidantes, formando o 2,2 difenil-1-picrilhidrazil, que é amarelado.

Para a quantificação da capacidade antioxidante das amostras foi necessário preparar uma curva padrão de trolox, com o objetivo de representar o percentual de inibição (PI %) da amostra frente à concentração da curva padrão.

Inicialmente uma solução de DPPH 60  $\mu\text{M}$  foi preparada dissolvendo 2,4 mg de radical DPPH<sup>\*</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA, Lote: STBC1252V), previamente pesado em balança analítica (CAHN, Mod.C-35, USA), em álcool metílico em um balão volumétrico de 100 mL. Posteriormente, uma solução padrão de trolox 2000  $\mu\text{M}$  foi preparada dissolvendo 25,0 mg de reagente Trolox em álcool etílico em um balão volumétrico de 50 mL. Ambas as soluções, depois de preparadas, foram homogeneizadas e transferidas para frascos de vidro âmbar para evitar a degradação pela luz. As soluções eram preparadas e usadas apenas no dia da análise. A partir da solução padrão de trolox (2000  $\mu\text{M}$ ), preparou-se, em balões volumétricos de 10 mL, soluções com as seguintes concentrações: 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 e 1200  $\mu\text{M}$ .

Em ambiente escuro, transferiu-se para tubos de ensaio alíquotas de 0,1 mL de cada solução trolox diluída, que foi misturada a 3,9 mL da solução de DPPH (60  $\mu\text{M}$ ). Utilizou-se 0,1 mL de álcool etílico como solução controle em substituição às soluções de trolox. Utilizou-se álcool metílico puro, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. Os tubos foram agitados manualmente (30 segundos) e deixados em repouso, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, por 30 minutos para que ocorresse a reação de oxi-redução. Imediatamente após os 30 minutos fez-se a leitura em espectrofotômetro UV-vis (Hach, Mod.DR/4000, USA) no comprimento de onda de 515 nm. A curva padrão de trolox foi obtida a partir de medidas de absorbância em triplicata e apresentada através do gráfico de PI (%) *versus* concentração de trolox ( $\mu\text{M}$ ), construído por regressão linear. O percentual de inibição de oxidação (% PI) foi determinado pela Equação 4.2.

$$PI (\%) = 100 \times \left( \frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \right) \quad \text{Eq. 4.2}$$

Onde:

$Abs_{controle}$  é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH;

$Abs_{amostra}$  é a absorbância da mistura reacional (DPPH + amostra);

Para a quantificação da capacidade antioxidante dos extratos do resíduo, estes foram inicialmente diluídos em etanol. A partir do extrato diluído, o restante do procedimento foi seguido conforme descrito no parágrafo anterior, verificando que o valor obtido da PI (%) permanecesse dentro da faixa de PI (%) da curva padrão.

A quantificação da capacidade antioxidante das amostras foi expressa como  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox (ET) / g de resíduo fresco (RF) através da utilização de uma curva padrão de trolox. Todos os ensaios foram realizados em duplicata, e a capacidade antioxidante foi apresentada por meio da média  $\pm$  desvio padrão. A utilização do ET visa facilitar a comparação entre as atividades antioxidantes obtidas pelos métodos DPPH e ABTS.

- **Método ABTS (2,2'-azinobis(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfônico)**

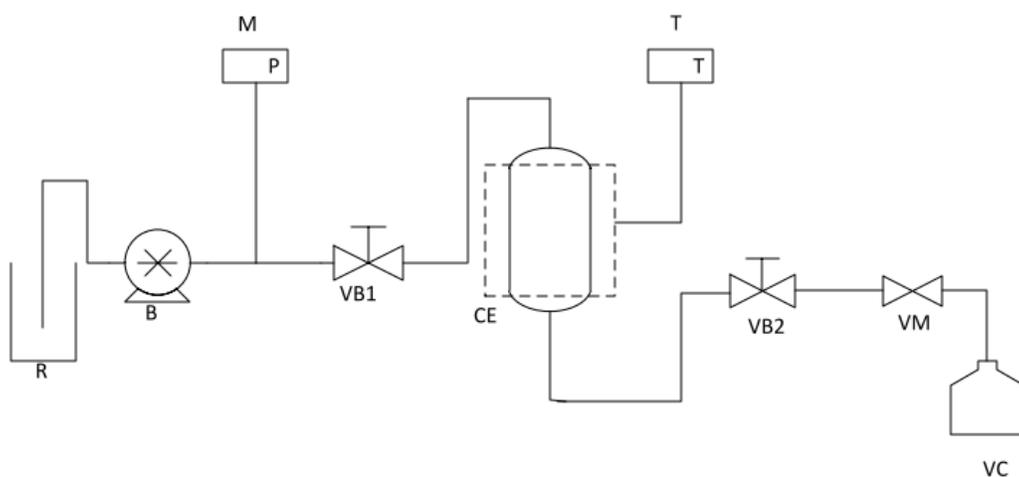
A capacidade antioxidante total dos extratos do bagaço da amora-preta frente ao radical livre  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  foi avaliada de acordo com Rufino et al. (2007a), com algumas modificações. Assim como o  $\text{DPPH}^{\bullet}$ , o  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  apresenta excelente estabilidade em determinadas condições de análise. Porém, estes radicais apresentam algumas diferenças importantes. O radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$  já vem pronto para o uso e é solúvel em solventes orgânicos, enquanto o  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  precisa ser gerado antes por reações químicas (como o persulfato de potássio) ou enzimáticas, e é solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise tanto de amostras hidrofílicas como lipofílicas. Dessa forma, o cátion  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  foi produzido reagindo 5 mL de solução aquosa de ABTS (7 mM) e 88  $\mu\text{L}$  de solução de persulfato de potássio (140 mM). A mistura, que se apresentou com cor esverdeada, foi armazenada em frasco escuro e em temperatura ambiente por 16 horas e só depois foi diluída com etanol para obter absorvância de  $0,700 \pm 0,050$  a 734 nm. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30  $\mu\text{L}$  do extrato do bagaço diluído em etanol ou do antioxidante padrão Trolox para tubos de ensaio onde foi misturado com 3 mL da solução resultante do radical ABTS. Após 6 minutos de reação, as leituras a 734 nm foram realizadas em espectrofotômetro UV-vis (Hach, Mod.DR/4000, USA). A curva padrão foi linear entre 100-2000  $\mu\text{M}$  de Trolox. Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol}$

equivalente de Trolox (ET)/g de resíduo fresco (RF). Todos os ensaios foram realizados em duplicata

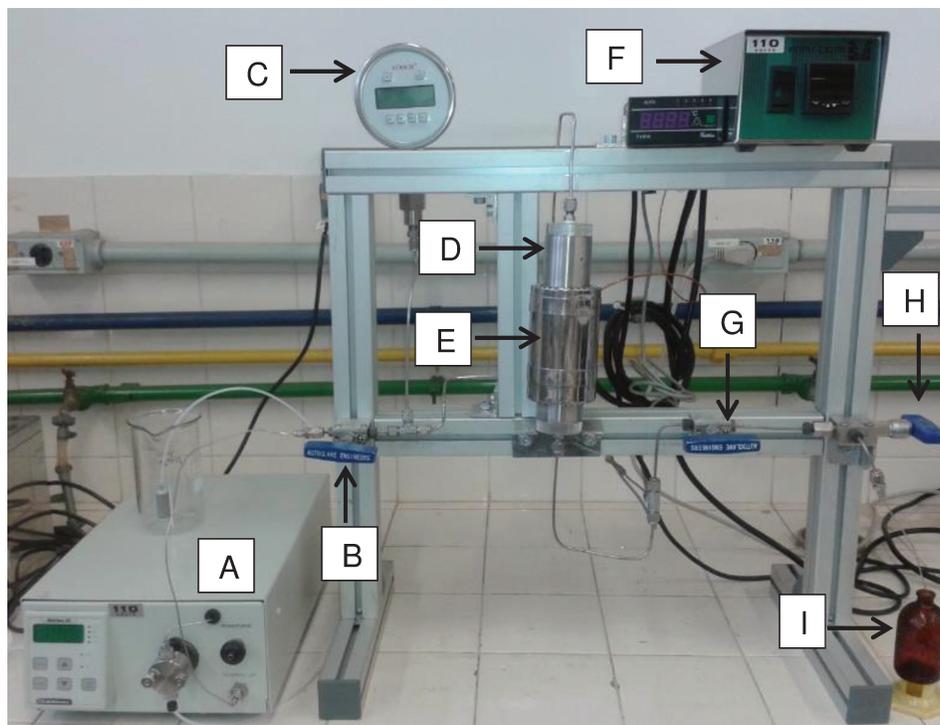
## 4.4 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO

### 4.2.1 Unidade de Extração

As extrações com líquido pressurizado foram realizadas com o equipamento esquematicamente, ilustrado na Figura 4.2. O equipamento é composto por: uma bomba de HPLC (LabAlliance, USA), que opera com vazões na faixa de 0,01 – 10,0 mL/min; duas válvulas de bloqueio (VB), responsáveis por controlar a entrada ou a passagem de fluido; um manômetro; uma válvula micrométrica (VM), que se trata de uma válvula de regulagem de fluxo, mas que foi usada para o controle e manutenção da pressão atrás da regulagem da vazão do solvente; um indicador e controlador de temperatura (CT); uma célula de extração de aço-inox de 100 mL contendo filtro metálico na saída da célula; uma “camisa” de aquecimento elétrico, utilizada para revestir a célula de extração (CE) e, assim, mantê-la na temperatura de extração até que a pressão requerida fosse atingida; e um recipiente de coleta. Todas as ligações dentro do sistema são feitas de tubos de aço inoxidável (1/16" e 1/8"). A Figura 4.3 mostra a fotografia da unidade PLE utilizada.



**Figura 4. 3** – Diagrama esquemático da unidade de extração com líquido pressurizado (PLE). R - Recipiente (solvente); B - Bomba de solvente; M - Manômetro; VB1 - Válvula de bloqueio 1; CE - Célula de extração revestida com manta de aquecimento; VB2 - Válvula de bloqueio 2; VM – Válvula micrométrica; T – Controlador e indicador de temperatura; VC – Vaso de coleta.



**Figura 4. 4** – Unidade PLE. A - Bomba de HPLC; B - Válvula de bloqueio 1; C – Manômetro; D - Célula de extração, E – Camisa de aquecimento elétrico; F – Controlador e indicador de temperatura; G – Válvula de bloqueio 2; H –Válvula micrométrica e I – Frasco de coleta.

#### 4.2.2 Condições de Extração

Os ensaios de extração foram realizados empregando três temperaturas (60, 80 e 100 °C), quatro diferentes solventes e mantendo constantes todas as outras variáveis do processo, como pressão, tempo de extração e a razão (S/F) entre a massa do solvente (S) usado no processo e a massa de matéria-prima (F). Dessa forma, foram testadas 12 diferentes condições de extração, apresentadas na Tabela 4.2, que foram realizadas aleatoriamente e em duplicata. Os solventes utilizados foram: etanol puro (Et.), mistura de etanol e água (50 % v/v) (Et.+Ag.), água destilada pura (Ag.) e água acidificada com pH 2,5 (Ag.pH 2,5). O pH foi mensurado utilizando um pHmetro e ajustado através da adição direta do padrão ácido cítrico (Synth<sup>®</sup>, Brasil, Lote: 44173).

**Tabela 4. 2** – Planejamento experimental dos ensaios de extração por PLE.

Experimentos	Variável: Solvente	Variável: T (°C)
1	Água	60
2	Água acidificada pH 2,5	60
3	Etanol	60
4	Etanol e Água (50 % v/v)	60
5	Água	80
6	Água acidificada pH 2,5	80
7	Etanol	80
8	Etanol e Água (50 % v/v)	80
9	Água	100
10	Água acidificada pH 2,5	100
11	Etanol	100
12	Etanol e Água (50 % v/v)	100

Os valores de vazão, pressão, tempo de extração, massa de matéria-prima, temperatura e pH utilizados para a realização do trabalho foram determinados com base nas limitações de operação do equipamento e de acordo com os estudos realizados por Carabias-Martínez *et al.* (2005), Wiboonsirikul e Adachi (2008), Wijngaard *et al.* (2012) e King e Grabiell (2007). É importante ressaltar que a opção de manter a pressão fixa foi baseada no fato em que fluidos no estado de agregação líquido são na sua grande maioria substâncias incompressíveis. Dessa maneira, os efeitos da pressão sobre as suas propriedades chegam a ser insignificantes. Por isso, pesquisadores geralmente aplicam uma pressão constante nos experimentos que empregam a técnica PLE (Ramos, Kristenson e Brinkman, 2002; Mustafa e Turner, 2011). Os valores das condições mantidas constantes estão apresentados na Tabela 4.3.

Para conseguir manter a mesma razão (S/F) em todos os ensaios, diferentes vazões foram empregadas para cada tipo de solvente, já que estes possuem diferentes densidades. Os valores foram:

- ✓ 3,00 mL/minuto – para a água destilada pura e para a água acidificada pH 2,5;
- ✓ 3,80 mL/minuto – para o etanol puro;
- ✓ 3,35 mL/minuto – para a mistura de etanol e água (50 % v/v).

A escolha do tempo de extração e da razão (S/F = 18) foi realizada com base em testes de extração feitos anteriormente na unidade PLE, utilizando a água pura como solvente extrator do bagaço da amora-preta.

**Tabela 4. 3** – Parâmetros operacionais adotados para os ensaios de extração por PLE.

<b>Parâmetros</b>	
F (g resíduo)	5
S/F (g solvente/g resíduo)	18
Tempo de extração (min)	30
Pressão de Extração (bar)	75,0 ± 5,0
Temperaturas (° C)	60, 80 e 100
Vazões (mL/min)*	3,00 (Ag. e Ag.pH 2,5); 3,35 (Et.+Ag) e 3,80 (Et.)
Solventes	Et., Et.+Ag., Ag. e Ag.pH 2,5

\* Os valores de densidades empregados para os cálculos das vazões foram: 1,000 g/mL (Ag. e Ag.pH 2,5), 0,789 g/mL (Et.) e 0,895 g/mL (Et.+Ag.).

### 4.2.3 Procedimento Operacional de Extração

O procedimento operacional de extração com líquido pressurizado foi padronizado para todas as condições utilizadas:

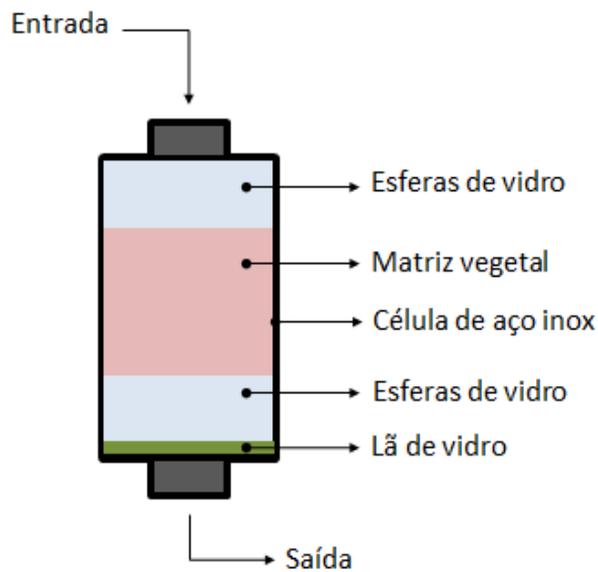
- a) Inicialmente a cada corrida, preparou-se o empacotamento do leito da célula de extração (CE) de aço-inox de 100 mL (veja Seção 4.2.3.1);
- b) Logo depois, a CE contendo a matéria-prima era acoplada à camisa de aquecimento desligada, e conectada às tubulações;
- c) Verificou-se se a válvula de bloqueio (VB1) estava aberta e se a VB2 e a micrométrica (VM) estavam fechadas;

- d) Ligou-se o manômetro (M) e o controlador do sistema de aquecimento da célula de extração, o qual era programado para operar na temperatura requerida do processo;
- e) Esperou-se em torno de 25 minutos para que toda a célula de extração alcançasse a temperatura de extração desejada;
- f) Acionou-se a bomba de HPLC na vazão desejada, para começar o bombeamento do solvente rumo a CE;
- g) Quando a pressão e a temperatura do sistema estavam estabilizadas (isso demorava em torno de 15 minutos para cada ensaio), a VB2 foi aberta e logo em seguida a VM, que era aberta vagarosamente para impedir que uma queda de pressão brusca acontecesse no sistema;
- h) As primeiras 5 gotas de extrato eram descartadas (para poder eliminar o solvente residual da extração feita anteriormente) e então começava-se a cronometrar o tempo estipulado para a extração (30 minutos);
- i) Após o tempo pré-estabelecido de extração, desligava-se a bomba HPLC, o CT e fechava-se a VM;
- j) O volume do extrato era aferido usando uma proveta de 100 mL;
- k) Finalmente, o extrato contido no vaso de coleta (VC) tipo âmbar era recolhido, identificado e armazenado em freezer doméstico em temperatura de -18°C, até a realização das análises;
- l) Para eliminar o extrato residual-solvente que ficava na célula extratora, a VM era totalmente aberta e esperava-se até que se esgotasse a saída de fluido;
- m) A CE era retirada do sistema para ser lavada, e com isso ficar preparada para que uma nova extração pudesse ser realizada.
- n) Antes de começar uma nova extração, o solvente a ser empregado na nova corrida era circulado pela tubulação que conectava a bomba á célula extratora. Fazia-se isso para certificar a ausência de residual-solvente na linha.

#### ***4.2.3.1 Preparo do Leito de Extração***

O preparo do leito seguiu um procedimento padrão para todas as extrações com líquido pressurizado. Com a extremidade inferior da célula de extração (CE - aço-inox de

100 mL) fechada, depositou-se uma camada de lã de vidro em sua base cilíndrica, com o objetivo de impedir a passagem de partículas que pudessem causar obstrução na tubulação, e logo depois certa quantidade de esferas de vidro. Em seguida cerca de 5,0 g de resíduos da amora-preta foram inseridos, sobre o qual mais certa quantidade de esferas de vidro foi adicionada. O preparo do leito era finalizado fechando a extremidade superior da célula. A Figura 4.4 apresenta o esquema do empacotamento do leito da célula de aço-inox de 100 mL.



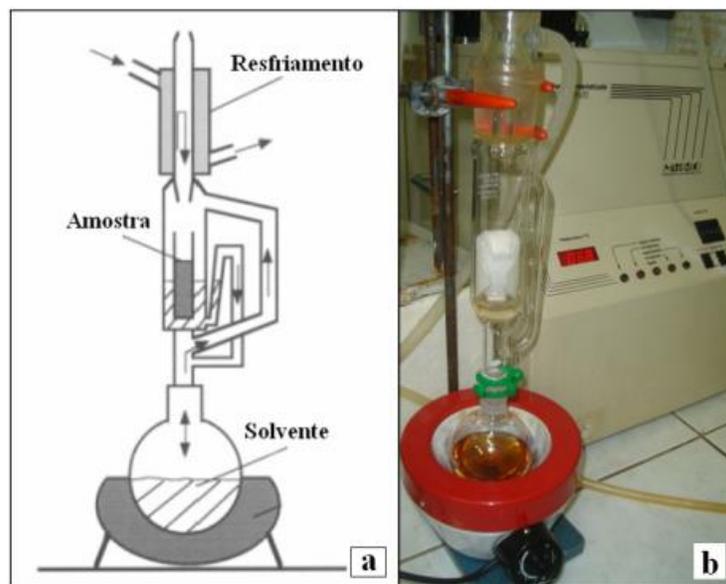
**Figura 4. 5** – Esquema do empacotamento do leito da célula de PLE de aço-inox de 100 mL.

#### **4.5 EXTRAÇÃO CONVENCIONAL: SOXHLET**

Amostras do resíduo da amora-preta foram submetidas à extração convencional Soxhlet de acordo com a metodologia descrita no Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005) (Lutz, 2005), empregando o metanol (Êxodo Científica, Brasil, Lote: AM9113RA) e o etanol (Êxodo Científica, Brasil, Lote: AE5761RA) como solventes de extração, á temperatura em torno de 40 °C.

Conforme apresentado na Figura 4.5 (a) e (b), o sistema Soxhlet consistia de um extrator que era acoplado, na extremidade inferior, a um balão volumétrico de vidro com

fundo redondo e capacidade para 250 mL, e na extremidade superior, a um condensador, arrefecido com água ambiente proveniente da própria canalização do LAPEA.



**Figura 4. 6** – Esquema representativo (a) e foto (b) do aparelho experimental utilizado na extração pela técnica Soxhlet.

No extrator foi colocado um cartucho de papel de filtro contendo cerca de 5 g de resíduo, enquanto no balão foram adicionados 200 mL de solvente, que foi aquecido em uma manta de aquecimento elétrica (Fisatom, Mod.52, Brasil). O vapor do solvente subia até o condensador, onde se resfriava e condensava gotejando (aproximadamente 4 gotas por segundo) sobre a matriz vegetal contida no extrator, solubilizando os compostos. O extrator lentamente enchia com o solvente condensado até ser esvaziado por ação de sifão, sendo então enviado de volta ao balão e o processo de refluxo era repetido continuamente durante 5 horas de extração. Em cada ciclo, novos compostos eram dissolvidos no solvente que se evapora novamente, deixando a substância dissolvida no balão. Terminada a extração, mensurou-se o volume dos extratos obtidos com uma proveta de 250 mL. Logo em seguida estes foram devidamente etiquetados e armazenados em freezer doméstico (Consul, Mod.CRB36, Brasil) a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises. As extrações foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Está técnica de extração foi realizada com intuito de comparar os resultados de rendimento global ( $X_0$ ) e a qualidade dos extratos (FT, AM e AA) com aqueles encontrados empregando a técnica PLE.

#### **4.6 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO GLOBAL ( $X_0$ )**

O percentual do rendimento global ( $X_0$ ) dos extratos obtidos tanto pela técnica PLE como pelas técnicas convencionais Soxhlet e Maceração (veja Seção 4.3.2.2) foi calculado relacionando a massa total de extrato ( $M_{extrato}$ ) em base seca e a massa de alimentação do resíduo fresco (RF) da amora-preta ( $F$ ), de acordo com a Equação 4.3.

A  $M_{extrato}$  foi determinada retirando 8,0 mL dos extratos líquidos e inserindo-os em frascos anteriormente pesados em balança analítica. Em seguida os frascos foram levados a estufa convencional a 105 °C onde eram deixados até peso constante. Depois eram levados para dissecadores para resfriarem e serem pesados novamente. Como se conhecia o volume total de cada extrato, então por uma simples regra de três determinou-se as massas de cada extrato.

$$X_0 = \frac{M_{extrato}}{F} \times 100 \quad \text{Eq. 4.3}$$

#### **4.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS**

A caracterização dos extratos líquidos do bagaço da amora-preta obtidos pelas extrações com líquido pressurizado e pelas extrações a baixa pressão (extração Soxhlet), foram avaliadas em termos do teor de fenólicos totais (FT), do teor de antocianinas monoméricas totais (AM) e da atividade antioxidante total (AA), seguindo as metodologias descritas nas seções 4.3.2.3, 4.3.2.4 e 4.3.2.5, respectivamente.

Além dessas análises, foi feito a identificação e quantificação das antocianinas majoritárias e minoritárias existentes nos extratos obtidos pela técnica PLE, por meio da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography*) e da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – *High*

*Performance Liquid Chromatography*) de acordo com as metodologias apresentada a seguir..

#### **4.7.1 Identificação das Antocianinas por UPLC-QToF-MS**

Para a identificação das antocianinas foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência ACQUITY UPLC<sup>®</sup> acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolo (UPLC-QToF-MS) (Synapt G2, Waters Corp., Milford, MA, USA) localizado nas dependências do Departamento de Química Analítica da Universidade de Cádiz (Espanha). O equipamento era composto pelos seguintes módulos: sistema de bomba quaternária ACQUITY UPLC, detector de arranjo de diodos ACQUITY UPLC, injetor automático ACQUITY UPLC, compartimento para a coluna e detector quadrupolo ACQUITY UPLC. Para o controle do instrumento e o processamento dos dados foi utilizado o *software* Empower<sup>™</sup> (versão 3.0, Waters). Extractos da PLE não concentrados foram passados através de um filtro de 0,20 µm de porosidade (Chromafil<sup>®</sup> Xtra, PA-20/25, Germany). Foi utilizada a coluna analítica ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C18, 1,7 µm, 2,1 × 100 mm (Waters, Irlanda). A temperatura da coluna e do injetor automático foi mantida a 50 e 15 °C, respectivamente. O volume de injeção dos extratos da PLE foi ajustado para 3,0 µL.

A eluição da fração de antocianinas foi utilizada com fases móveis, água (solvente A) e metanol (solvente B) sendo o primeiro contendo 2 % de ácido fórmico. O gradiente linear aplicado foi: 0 min, 15 % B; 3,30 min, 20 % B; 3,86 min, 30 % B; 5,05 min, 40 % B; 5,35 min, 55 % B; 5,64 min, 60 % de B, 5,94 min, 95 % B; 7,50 min, 95 % B. O tempo de execução total da corrida foi de 12 min, incluindo 4 min para o ré-equilíbrio da coluna. A vazão de solvente foi de 0,4 mL/min. A determinação dos analitos foi realizada por meio de uma fonte de electrospray (ES), operando no modo de ionização positivo nas condições que se seguem: dessolvatação de fluxo de gás = 700 L/h, temperatura de dessolvatação = 500 ° C, fluxo de gás do cone = 10 L/h, temperatura da fonte = 150 ° C, voltagem do capilar = 700, voltagem do cone = 30 V de tensão cone e energia de colisão = 20 eV. Modo de varredura completa foi utilizada ( $m/z = 100 - 800$ ). O efluente do sistema cromatográfico também passou pelo detector de arranjo de diodos (espectro UV-vis) onde as antocianinas foram monitoradas de 200 a 600 nm.

#### **4.7.2 Separação e Quantificação das Antocianinas por HPLC-DAD**

A quantificação de antocianinas foi realizada num HPLC-DAD Elite LaChrom (VWR Hitachi, Tóquio, Japão) consistindo de um injetor automático de amostras (L-2200U), um forno para coluna (L2300), uma bomba (L-2160) e um detector UV-Vis (L-2420U). O forno de coluna foi ajustado a 50 °C para a cromatográfica. O detector UV-Vis foi fixado a 520 nm para as análises. As antocianinas foram analisadas numa coluna C18 Halo™ Hitachi LaChrom (100 x 3 mm de diâmetro, tamanho de partícula 2,7 µm). Um método de gradiente, usando água acidificada (ácido fórmico a 5%, de solvente A) e metanol (solvente B), trabalhando a uma vazão de 1,0 mL/min, foi utilizado para a separação cromatográfica. O gradiente utilizado foi como se segue: 0 min, 15 % B; 1,50 min, 20 % B; 3,30 min, 30 % B; 4,80 min, 40 % B; 5,40 min, 55 % B; 5,90 min, 60 % B; 6,60 min, 95 % B; 9,30 min, 95 % B, 10 min, 15 % B.

Os picos das antocianinas individuais detectados nas corridas cromatográficas foram identificados pela comparação dos tempos de retenção dos respectivos padrões do extrato da amora-preta analisados usando UPLC-QToF-MS. A concentração dos compostos identificados foi calculada pelas curvas de calibração obtidas usando soluções dos padrões puros. Foram preparadas curvas de calibração para cada padrão com concentração variando de 0 a 60 mg/L (ppm). Os resultados foram expressos como mg de antocianina/g de resíduo fresco (RF). Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão de três diferentes injeções.

#### **4.8 ESTUDO CINÉTICO DE EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO**

Para os experimentos cinéticos foram adotados praticamente os mesmos procedimentos operacionais (Seções 4.2.3 e 4.2.3.1) da unidade de extração com líquido pressurizado.

Por meio da avaliação dos valores de rendimento global e da qualidade dos extratos (FT, AM e AA) foi selecionada a melhor condição de processo (valores de  $X_0$  e AM elevados; e valores máximos para FT e AA (DPPH e ABTS)), e nesta condição foi estudada a cinética de extração em diferentes vazões do solvente. As vazões utilizadas foram: 1,67;

3,35 e 6,70 mL/min. Estes valores foram selecionados com base nos limites de operação da unidade. Uma vez selecionada a condição ótima, segundo os critérios pré-estabelecidos, os experimentos cinéticos foram realizados em duplicata.

Para os estudos da cinética de extração foram construídas curvas globais de extração (OEC), expressando rendimento global de extração acumulado  $X_0$  (%) em função do tempo de extração (min). Durante o processo de PLE, foram coletadas amostras de extratos em frascos previamente pesados e em intervalos de tempos pré-determinados (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100 e 120 min). As amostras dos extratos foram levadas à estufa convencional a 105 °C para evaporar o solvente, e depois de adquirirem peso constante, foram pesadas em balança analítica. Ao final, as OEC's foram apresentadas em gráfico com a finalidade de estudar o efeito da vazão sobre o processo de extração em função do rendimento global *versus* o tempo.

#### **4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados de rendimento ( $X_0$ ), FT, AM e de AA obtidos para os diferentes extratos de bagaço da amora-preta foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), ao nível de 5 % de significância (p-valor < 0,05), seguida pelo teste de Tukey para comparação das médias, com o auxílio do *software* SAS versão 9.2 *for Windows* (SAS Institute, Cary, NC).

Todos os resultados obtidos pelas análises de caracterização químicas, seja dos extratos ou do resíduo *in natura*, foram expressos pela sua média  $\pm$  desvio padrão

## **. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO RESÍDUO**

Os resultados da composição centesimal, pH e dos teores de compostos bioativos detectados no resíduo da polpa da amora-preta encontram-se na Tabela 5.1.

**Tabela 5. 1** – Composição química do resíduo da polpa da amora-preta (*Rubus spp.*) variedade Caingangue.

<b>Avaliações</b>	<b>Valor médio ± Desvio padrão</b>
Umidade (%)	69,14 ± 0,06
Proteínas (%)	9,83 ± 0,15
Lipídeos (%)	0,87 ± 0,01
Cinzas (%)	0,51 ± 0,01
Carboidratos (%)	19,66 ± 0,10
pH	3,38 ± 0,01
SS (° Brix)	13,40 ± 0,24
FT (mg EAG/g RF)	3,65 ± 0,18
AM (mg EC3G/g RF)	1,21 ± 0,02
DPPH (µmol ET/g RF)	28,64 ± 1,69
ABTS (µmol ET/g RF)	45,70 ± 1,06

O resíduo apresentou elevado teor de umidade, característica comum aos bagaços gerados do processamento das diferentes pequenas frutas vermelhas (Boari Lima *et al.*, 2008; Santiago, 2010; Santos, 2011; Cavalcanti, 2013), o que dificulta a conservação dos mesmos no estado *in natura*, sendo importante serem armazenados sob condições de baixas temperaturas ou então desidratados. Porém, a desidratação pode não ser viável quando se tem interesse em extrair compostos bioativos, já que muitos deles são instáveis frente a elevadas temperaturas. Além disso, acredita-se que a água presente na matéria-prima possa apresentar um caráter pré-extrativo dos compostos de interesse devido o seu alto índice de

polaridade (9,0) e seu poder de intumescimento, facilitando assim o transporte de massa durante o período de extração (Cavalcanti, 2013).

Os teores de proteína bruta, carboidratos e sólidos solúveis totais (° Brix) foram relativamente elevados quando comparados com outros bagaços (Boari Lima *et al.*, 2008; Silva, 2012), com a fruta inteira de diferentes variedades (Hirsch *et al.*, 2012) e com os produtos resultantes da fruta inteira (Wang e Xu, 2007; Araújo, 2009). O alto teor de carboidratos não é referente somente às pequenas moléculas de açúcares (como sacarose, frutose, glicose, maltose), mas sim à soma destas com estruturas insolúveis mais complexas, como a celulose, a hemicelulose e as ligninas, que constituem as fibras alimentares. Dessa forma, isso faz da matéria-prima do presente trabalho um material bastante fibroso, que é uma característica marcante dos resíduos oriundos das pequenas frutas vermelhas (Antunes e Raseira, 2004).

Os demais parâmetros da composição centesimal (cinzas e lipídeos) e o valor de pH, apresentaram-se semelhantes aos encontrados na literatura (Boari Lima *et al.*, 2008; Silva, 2012; Cavalcanti, 2013). Segundo Antunes (2002) a amora-preta de diferentes cultivares apresenta baixas quantidades de gordura (em torno de 0,8 e 0,15% respectivamente, em base úmida), seguindo o mesmo padrão de outras pequenas frutas vermelhas, como morango, mirtilo e framboesa. Diante disso, já se esperava que o resíduo contivesse um baixo teor de lipídeos. O pH dos materiais orgânicos de uma forma indireta está inteiramente interligado na cor da fruta e na capacidade de conservação da mesma. As antocianinas monoméricas, pigmentos responsáveis pela coloração característica da amora-preta e do seu resíduo, além de serem mais estáveis em soluções ácidas, em pH em torno de 3,0 sua estrutura predominante é o cátion-flavílico (AH<sup>+</sup>) (ver Seção 3.2.1.1) que é o contribuinte que dá a coloração vermelha da fruta e conseqüentemente a do resíduo.

Os resultados da quantificação dos compostos bioativos obtidos da maceração do bagaço foram bastante representativos. Os conteúdos de FT e AM encontrados nos diferentes trabalhos realizados com a amora-preta e com seus subprodutos estão entre 1,93 a 4,86 mg equivalente de ácido gálico/g de amostra, e 0,67 a 2,48 mg equivalente cianidina-3-glucosídeo/g de amostra, respectivamente (Siriwoharn *et al.*, 2004; Jacques *et al.*, 2010; Vizzotto e Pereira, 2011). Como mostrado na Tabela 5.1, os resultados do presente trabalho estão dentro dessas faixas. Estas amplas faixas se devem às possíveis alterações na

composição das frutas de acordo com as condições climáticas, estágio de maturidade, cultivar, manejo com o material, armazenamento e forma de extração.

Os teores de compostos fenólicos totais (FT) e de antocianinas monoméricas (AM) foram semelhantes aos encontrados em outros trabalhos realizados com resíduos e com a fruta (Mota, 2006; Boari Lima *et al.*, 2008; Ferreira, 2008; Araújo, 2009; Kwiatkowski *et al.*, 2010; Silva, 2012), mas, na maioria, menores aos relatados em estudos feitos com frutos inteiros da amora-preta (Siriwoharn *et al.*, 2004; Chim, 2008; Vizzotto e Pereira, 2011) e com produtos derivados do processamento destes, como néctares, geleias e polpas (Chim, 2008; Jacques *et al.*, 2010). Isso ocorre porque os compostos bioativos são, na sua maioria, sensíveis às etapas de processamento, sendo facilmente degradados quando expostos a luz, aquecimento/resfriamento, oxigênio, enzimas e íons metálicos (Malacrida e Motta, 2006).

Em relação aos valores de atividade antioxidante (método DPPH e ABTS), de uma forma geral ambos de enquadram dentro dos valores relatados por diferentes trabalhos usando a amora-preta e seus subprodutos como matéria-prima. Normalmente para DPPH os valores variam de 10,1 a 79,2  $\mu\text{mol ET/g}$  amostra (Araújo, 2009; Chim, 2008; Hirsch *et al.*, 2012; Vizzotto e Pereira, 2011), e para ABTS de 22,1 a 270,6  $\mu\text{mol ET/g}$  amostra (Ferreira, 2008; Aybastier *et al.*, 2013), e como pode se ver (Tabela 5.1) os valores encontrados no presente trabalho então dentro destas faixas.

Diante tudo isso, pode-se dizer que a composição química do resíduo de amora-preta indica que o mesmo constitui uma boa fonte de nutrientes para aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e química.

## **5.2 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDOS PRESSURIZADOS**

Na Tabela 5.2 são apresentados os valores obtidos para teores de antocianinas monoméricas totais (AM), polifenóis extraíveis totais (FT), atividade antioxidante (AA - método DPPH e ABTS) e rendimento global de extração ( $X_0$ ) obtidos nas extrações por PLE do bagaço da amora-preta. Para facilitar a discussão destes resultados (Tabela 5.2), estes foram separados em subseções, que estão apresentadas a seguir. Os resultados observados expõem boas concentrações dos compostos bioativos estudado.

**Tabela 5. 2** – Resultados obtidos da extração com líquido pressurizado a partir do bagaço da amora-preta.

Temp. (°C)	Solvente	$X_0^a$	FT <sup>b</sup>	AM <sup>c</sup>	Atividade Antioxidante <sup>d</sup>	
					DPPH	ABTS
60	Água	3,56 ± 0,71	2,39 ± 0,21	0,88 ± 0,01	14,25 ± 0,74	21,26 ± 0,74
60	Água pH 2,5	12,10 ± 0,49	1,93 ± 0,21	0,95 ± 0,08	12,25 ± 0,21	31,14 ± 6,35
60	Etanol	3,23 ± 0,08	3,18 ± 0,62	1,25 ± 0,03	24,33 ± 4,40	32,04 ± 6,75
60	Etanol (50 %)	3,85 ± 0,37	5,23 ± 0,83	1,40 ± 0,02	37,04 ± 2,80	49,24 ± 3,32
80	Água	4,16 ± 1,47	3,78 ± 0,03	0,79 ± 0,08	33,22 ± 0,08	36,46 ± 0,72
80	Água pH 2,5	14,27 ± 0,37	4,46 ± 0,25	0,99 ± 0,05	36,30 ± 0,78	43,97 ± 0,79
80	Etanol	4,23 ± 0,28	3,72 ± 0,60	1,39 ± 0,02	31,40 ± 4,38	31,48 ± 5,18
80	Etanol (50 %)	5,19 ± 0,08	5,51 ± 0,80	1,08 ± 0,21	46,38 ± 1,28	52,10 ± 3,32
100	Água	6,39 ± 0,36	4,97 ± 0,51	0,65 ± 0,10	42,85 ± 5,45	42,79 ± 6,70
100	Água pH 2,5	14,99 ± 0,05	5,34 ± 0,46	0,38 ± 0,04	40,40 ± 3,34	51,29 ± 12,94
100	Etanol	4,46 ± 0,24	4,12 ± 0,23	0,93 ± 0,03	36,61 ± 0,24	31,07 ± 4,60
100	Etanol (50 %)	6,33 ± 0,04	7,36 ± 0,18	1,02 ± 0,11	76,03 ± 1,05	68,28 ± 2,68

\*Resultados expressos pela sua média ± desvio padrão (DP).

<sup>a</sup> Rendimento global de extração expresso em porcentagem (g extrato seco/g resíduo fresco).

<sup>b</sup> Teor de compostos fenólicos totais expresso em equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de resíduo fresco.

<sup>c</sup> Teor de antocianinas monoméricas totais expresso em equivalente de cianidina-3-glicosídeo (EC3G) por grama de resíduo fresco.

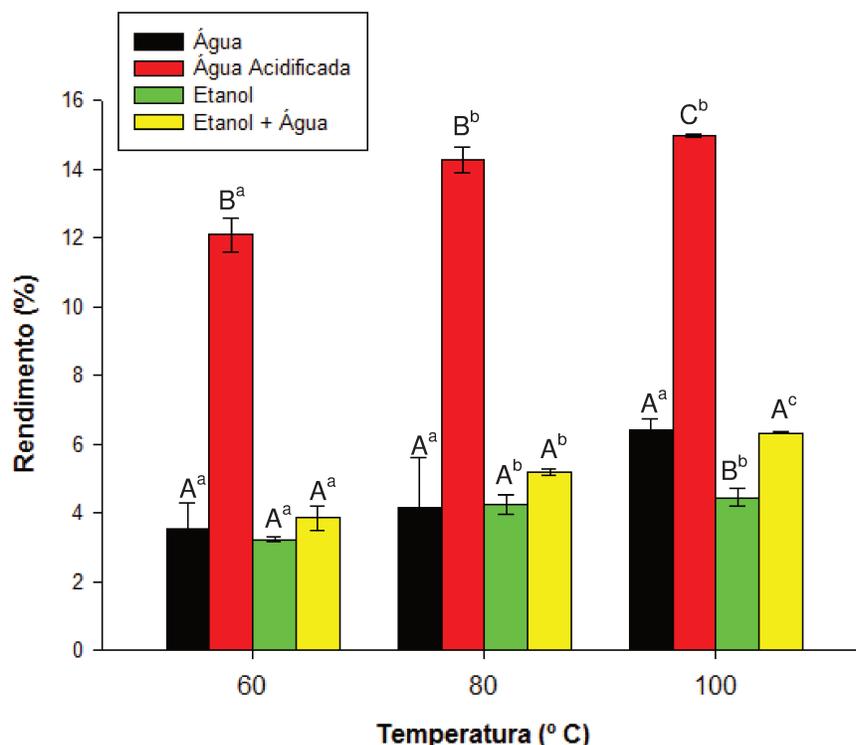
<sup>d</sup> Atividade antioxidante expresso em μmol de equivalente Trolox (ET) por grama de resíduo fresco.

Em Anexo (Seção 9) estão as curvas padrão de ácido gálico (Figura A.9.1) e de Trolox (Figuras A.9.2 e A.9.3), utilizadas para determinar as concentrações dos fenólicos totais (expressos em função do teor de equivalente de ácido gálico por grama de resíduo fresco) e do potencial antioxidante de cada extrato (expressos em  $\mu\text{mol}$  equivalente trolox por grama de resíduo fresco). Os gráficos das Figuras A.9.2 e A.9.3 foram empregados para determinar a atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, respectivamente.

### **5.2.1 Rendimento Global de Extração ( $X_0$ )**

A Figura 5.1 apresenta a resposta do planejamento experimental realizado para os rendimentos globais de extração ( $X_0$ ) dos extratos subcríticos. Verifica-se que os maiores  $X_0$  foram de 12,10; 14,27 e 14,99 %, obtidos nas condições em que se empregou a água acidificada pH 2,5 como solvente extrator nas temperaturas de 60, 80 e 100 °C, respectivamente. Para as outras condições, os rendimentos globais ficaram em torno do valor médio de 4,60 %, sendo na sua maioria estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ). Como segundo melhor solvente extrator, analisando a Figura 5.4, pode-se dizer que foi a mistura hidroetanólica. Nota-se que aqueles valores (12,10; 14,27 e 14,99 %) foram bastante discrepantes do restante. Isso possivelmente ocorreu porque meios acidificados devem contribuir para uma maior solubilização de carboidratos (pectinas, gomas e hemiceluloses) e proteínas, e como relatado na discussão sobre caracterização química do resíduo (ver Tabela 5.1), a matriz vegetal em estudo é altamente rica nestes compostos; ou também pode ter promovido à hidrólise/degradação de alguns compostos, como fibras e açúcares, promovendo o aumento do rendimento global.

A Tabela A.9.1 mostra a Análise de Variância (ANOVA) dos resultados experimentais para o rendimento global de extração ( $X_0$ ). Nesta tabela é possível observar que os efeitos das variáveis independentes (temperatura e solvente) são estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) durante o processo de extração, entretanto, o mesmo não é observado para o efeito da interação (temperatura\*solvente) ( $p = 0,1362$ ).



\* Letras maiúsculas iguais indicam que não existe diferença dos solventes dentro da mesma temperatura, ao nível de 5 % de significância pelo teste Tukey.

\*\* Letras minúsculas iguais indicam que não existe diferença das temperaturas para os mesmos solventes, ao nível de 5 % de significância pelo teste Tukey.

**Figura 5. 1** – Rendimento de extração global ( $X_0$ ) dos extratos obtidos com líquido pressurizado expresso em porcentagem (g extrato seco/g de resíduo fresco).

Observa-se na Figura 5.1 que, para todos os solventes em estudo, aumentando-se a temperatura foi obtido um aumento no rendimento global de extração ( $X_0$ ). Isso ocorre devido ao fato do aumento da temperatura favorecer o rompimento das interações, causadas pelas forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e atrações dipolo-dipolo, entre os analitos e a matriz vegetal, diminuindo dessa forma a energia de ativação necessária para a dessorção dos mesmos. Além disso, elevadas temperaturas causam redução da viscosidade e da tensão superficial dos solventes, que contribui para uma melhor penetração do fluido para o interior da matriz e uma dissolução mais rápida dos solutos no fluido. Subsequentemente, há um aumento da taxa de transferência de massa, resultando no aumento do rendimento de extração (Wiboonsirikul e Adachi, 2008; Mustafa e Turner, 2011; Wijngaard *et al.*, 2012).

Contudo, mesmo o rendimento global sendo maior nas condições relatadas anteriormente (água acidificada pH 2,5 – em 60, 80 e 100 °C), observou-se que não houve um aumento da qualidade (FT, AM e AA) dos extratos, o que era esperado, quando comparado com a qualidade obtida nas outras condições de extração. Com isso, verifica-se que esse elevado rendimento se deve a extração de outros compostos, que não possuem caráter fenólico e antioxidante, pois não foi nestas condições em que se obtiveram maiores concentrações de FT e AM e maiores atividades antioxidantes (AA), como será visto nas próximas seções.

## **5.2.2 Caracterização Química dos Extratos**

### ***5.2.2.1 Compostos Fenólicos Totais***

Na Figura 5.2 está apresentada a resposta do planejamento experimental realizado para a variável dependente teor de compostos fenólicos totais (FT), expressa em mg equivalente de ácido gálico (EAG)/g resíduo fresco (RF). Verifica-se que as menores concentrações de polifenóis foram de 2,08 e 2,54 mg EAG/g RF obtidas nas condições de extração utilizando água acidificada pH 2,5 e água como solventes na temperatura de 60 °C, respectivamente (sendo que estas não possuem diferença significativa, pelo teste Tukey, a 5 % de significância), e as maiores concentrações foram de 7,37 e 5,51 mg EAG/g RF, nas condições em que se empregou a mistura de etanol e água (50 % v/v) nas temperaturas de 80 e 100 °C (os valores também não possuem diferença significativa). Valores semelhantes e ou superiores a estes foram encontrados por outros autores utilizando resíduo de jabuticaba e maçã como matéria-prima (Wijngaard e Brunton, 2009; Santos, Veggi e Meireles, 2012)

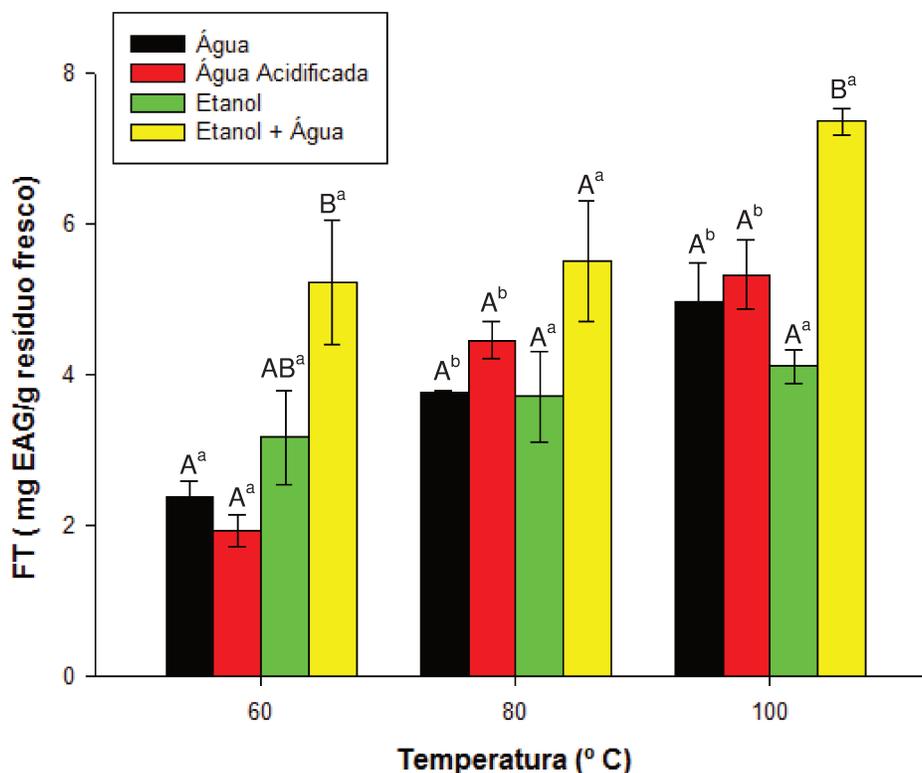
A Tabela A.9.2 (do Anexo 9.1.2) mostra a Análise de Variância (ANOVA) dos resultados experimentais de extração de FT do bagaço da amora-preta. Nesta tabela é possível observar que os efeitos das variáveis independentes (temperatura e solvente) são estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) durante o processo de extração, bem com a interação entre elas.

Observa-se que, para todos os solventes empregados, aumentando-se a temperatura tem-se um leve aumento nos teores de compostos fenólicos. Novamente, isso pode ocorrer porque com a elevação da temperatura, há um aumento na solubilidade dos fitoquímicos, um maior rompimento das ligações dos solutos com a matriz vegetal, um aumento na taxa de difusão, na de transferência de massa e na taxa de extração e, além disso, uma redução da viscosidade e tensão superficial do solvente, que contribuem para uma melhora no contato solvente-soluto (Wiboonsirikul e Adachi, 2008; Mustafa e Turner, 2011). Comportamento semelhante a este foi relatado por diversos estudos, mostrando que de 40 °C a 120 °C há uma crescente extração de compostos fenólicos quando se utilizam solventes no estado subcrítico (Ju e Howard, 2003; Ju e Howard, 2005; Monrad *et al.*, 2010). De acordo com Wijngaard *et al.* (2012), a temperatura é relatada como sendo um dos parâmetros de maior importância para a extração de polifenóis quando se emprega a técnica PLE como procedimento de extração.

De maneira geral, os solventes que extraíram maior quantidade de compostos fenólicos, em ordem decrescente, foram: mistura de etanol e água (50 % v/v) > água acidificada pH 2,5 > etanol puro > água pura. Apenas para a temperatura de 60 °C não se observa essa ordem. Então se percebe que existe um sinergismo entre os fatores temperatura e solvente, o qual contribui para uma melhora na extração de compostos fenólicos. Isso comprova os resultados preditos pela ANOVA (Tabela A.9.2), que mostra que a interação das variáveis independentes é significativa ( $p < 0,05$ ).

Vários trabalhos, empregando a PLE, têm mostrado maior eficiência na extração de compostos fenólicos de bagaços quando se utiliza mistura de solventes, principalmente nas proporções de 50 e 70 % de etanol aquoso (solvente hidroetanólico), do que na utilização deles puros. Os resultados estão de acordo com os de outros autores que sugerem que solventes com alta polaridade, como a água, e solventes com polaridades muito baixas, ou apolares, não são bons extratores (Vizzotto e Pereira, 2011). Segundo Vizzotto e Pereira (2011), os compostos fenólicos da amora-preta, bem como de outras pequenas frutas vermelhas, apresentam características moderadamente polares. Alguns relatos da literatura já têm mostrado que a água pura (considerada o solvente universal) em combinação com outros solventes orgânicos (principalmente o etanol e metanol) contribui para criar um meio moderadamente polar, pois a adição destes faz diminuir a sua polaridade, favorecendo a

extração de polifenóis. Além disso, um solvente pode melhorar a solubilidade do soluto (etanol), enquanto que o outro solvente pode auxiliar na dessorção do soluto a partir da matriz vegetal (água) (Mustafa e Turner, 2011). A utilização de etanol reduz o ponto de ebulição e afeta a polaridade do solvente. A concentração de etanol, portanto, tem um grande efeito sobre o rendimento de extração de polifenóis (Wijngaard e Brunton, 2009).



\* Letras maiúsculas iguais indicam que não existe diferença dos solventes dentro da mesma temperatura, ao nível de 5 % de significância pelo teste Tukey.

\*\* Letras minúsculas iguais indicam que não existe diferença das temperaturas para os mesmos solventes, ao nível de 5 % de significância pelo teste Tukey.

**Figura 5. 2** – Teor de compostos fenólicos (FT) dos extratos obtidos com líquido pressurizado expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG).

Muitos pesquisadores têm comprovado também que a acidificação (diminuição do pH) do solvente extrator aumenta a eficiência da extração de compostos bioativos. Isso pode ser verificado no presente trabalho, quando se compara os teores de fenólicos totais obtidos com a água pura com aqueles obtidos com água acidificada pH 2,5, apesar deles não se diferirem significativamente ao nível de 5 % de significância (Figura 5.2). O ácido

nos solventes age rompendo as membranas celulares facilitando a liberação e solubilização dos compostos bioativos (Ju e Howard, 2003).

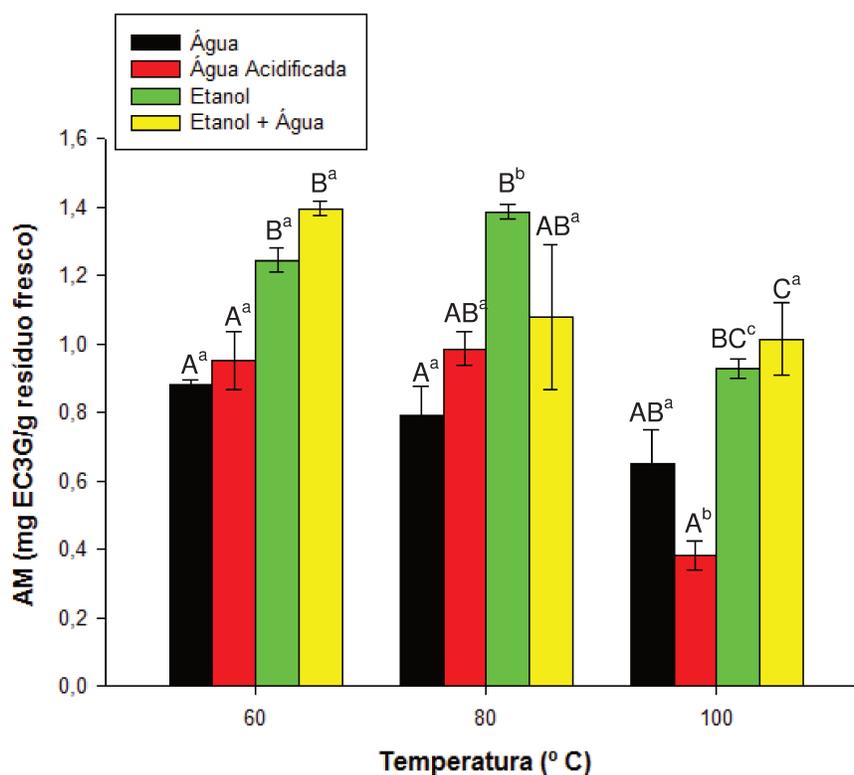
### **5.2.2.2 Antocianinas Monoméricas**

A Figura 5.3 apresenta o teor de antocianinas monoméricas totais (AM) presentes nos extratos obtidos por PLE nas condições operacionais estudadas. Nota-se que os melhores rendimentos de antocianinas (faixa de 1,08 a 1,40 mg EC3G/g RF) foram encontrados nas condições em que se empregou a mistura hidroetanólica (50 % v/v) e etanol puro como solventes extratores nas temperaturas de 60 e 80 °C. Resultados semelhantes a estes foram encontrados em bagaço de jabuticaba por Santos, Veggi e Meireles (2012). Nota-se, ainda, que os valores encontrados para aqueles dois solventes nas três diferentes temperaturas, não foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Na Tabela A.9.3 mostra a Análise da Variância (ANOVA) dos resultados experimentais de extração de antocianinas do bagaço da amora-preta. Nesta tabela é possível observar que os efeitos principais (temperatura e solvente) são estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) durante o processo de extração, assim como o efeito da interação temperatura\*solvente.

Pode-se observar na Figura 5.3 que, de uma maneira geral, o aumento da temperatura causou uma leve diminuição nos teores de antocianinas, sendo que estas diminuições foram, praticamente insignificantes estatisticamente, com exceção da água acidificada pH 2,5, que apresentou uma queda brusca do teor de antocianinas da temperatura de 60 e 80 para a de 100 ° C. Daí percebe-se que houve um sinergismo negativo da interação de elevadas temperaturas com solventes acidificados, contribuindo para uma maior degradação dos pigmentos antociânicos. O ácido, empregado conjuntamente com elevadas temperaturas, possivelmente resultou na hidrólise dos compostos acilados e dos resíduos de açúcar, inativando a estrutura química das antocianinas (Ju e Howard, 2003; Ju e Howard, 2005; Monrad *et al.*, 2010). A temperatura, por si só, é um dos fatores que mais afeta a estabilidade das antocianinas. Existem vários trabalhos mostrando que com o aumento da temperatura tem-se a degradação das mesmas. Simpson (1985) sugere que a degradação térmica das antocianinas pode ocorrer por meio de dois mecanismos: (1) pela hidrólise da

ligação 3-glicosídeo para formar a porção aglicona que é instável (veja Figura 3.4 da Seção 3.2.1.1), e (2) pela abertura hidrolítica do anel heterocíclico formando a chalcona, que é uma estrutura incolor das antocianinas (veja Figura 3.5 da Seção 3.2.1.1), que em elevadas temperaturas se degrada a um composto insolúvel castanho de natureza polifenólica. É interessante observar que os extratos obtidos no presente trabalho, nas temperaturas de 80 e 100 °C possuíram uma coloração marrom-avermelhada.



\* Letras maiúsculas iguais indicam que não existe diferença dos solventes dentro da mesma temperatura, ao nível de 5 % de significância pelo teste Tukey.

\*\* Letras minúsculas iguais indicam que não existe diferença das temperaturas para os mesmos solventes, ao nível de 5 % de significância pelo teste Tukey.

**Figura 5. 3** – Teor de antocianinas monoméricas (AM) dos extratos obtidos com líquido pressurizado expresso em equivalentes de cianidina-3-glicosídeo (EC3G).

Neste trabalho o teor de antocianinas monoméricas correspondeu, em média, a 27 % do total de compostos fenólicos presentes nos extratos. O resultado confirma o observado por (Siriwoharn *et al.*, 2004), o qual trabalhou com três cultivares diferentes de amora-preta. Ele verificou em todos os casos que a cianidina-3-glicosídeo foi o pigmento predominante. Entretanto, em comparação com a maioria dos trabalhos, essa relação

(AM/FT) é maior, chegando até 90 % (Ju e Howard, 2003; Ju e Howard, 2005; Howard e Pandjaitan, 2008; Wijngaard e Brunton, 2009; Monrad *et al.*, 2010). Mas nestes estudos os pesquisadores não usaram os mesmos solventes, o resíduo é oriundo de outra pequena fruta, e a forma de extração, mesmo empregando a técnica PLE, é um pouco diferente, o que pode explicar a diferença dos resultados. Além disso, a discrepância entre a perda de antocianinas e o aumento da recuperação de compostos fenólicos totais, em elevadas temperaturas de extração, pode ser explicada pela maior extração de compostos termicamente mais estáveis como as procianidinas e os ácidos fenólicos do resíduo da amora-preta. García-Marino *et al.* (2006) mostrou em seu trabalho, realizado com o bagaço de uva, que a solubilidade dos ácidos fenólicos como o gálico, caféico, felúrico e cumárico aumentam com o aumento da temperatura.

### **5.2.2.3 Atividade Antioxidante – Métodos DPPH e ABTS**

Os resultados de atividade antioxidante (AA) reportados na literatura, quando se aplica a técnica PLE, são bastante diversificados, variando não só com os métodos utilizados para a sua determinação, como também com a forma em que são expressos. Além desses, a diversificação também pode ser decorrente das condições operacionais empregadas, do solvente extrator, do tipo e da variedade da matéria-prima, bem como da época de sua colheita e tipos de pré-tratamento aos quais a amostra foi submetida.

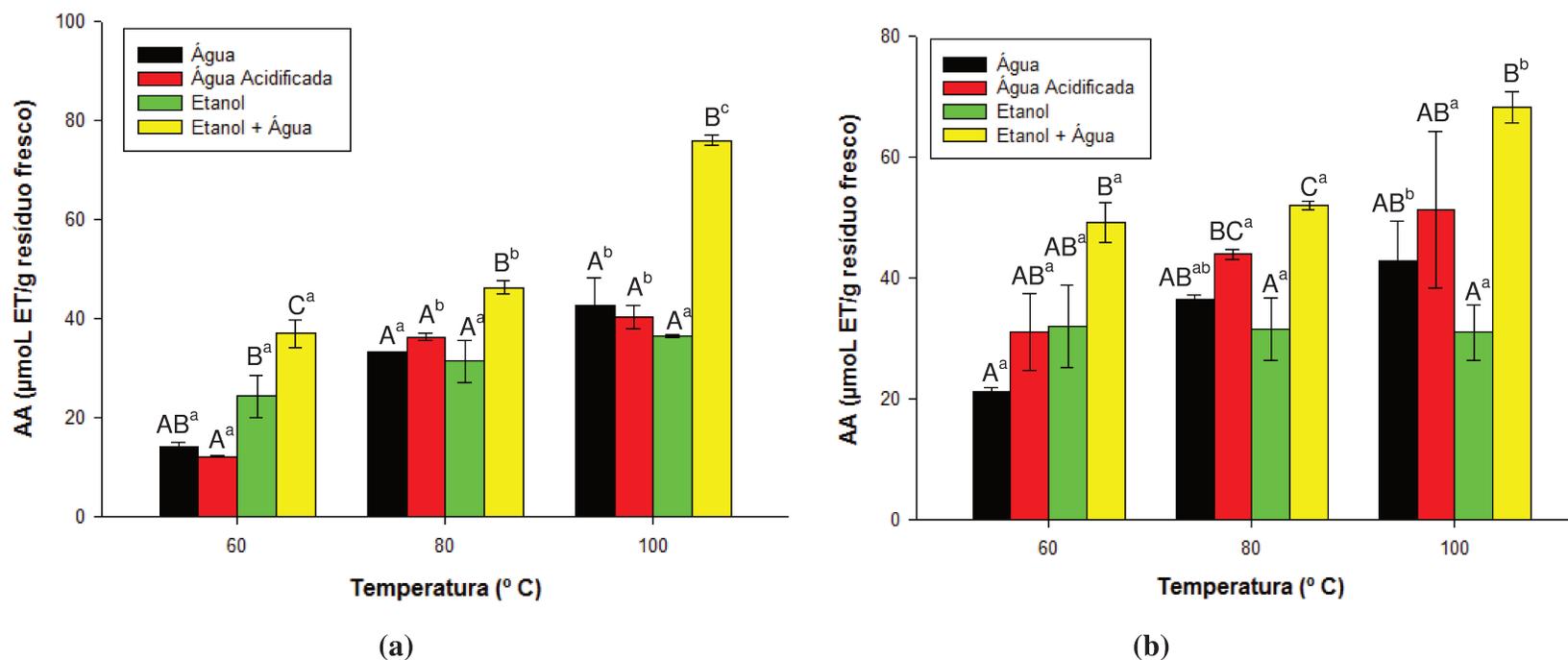
Observando a Figura 5.4 (a) e (b) é possível verificar que ambos os métodos (DPPH e ABTS), adotados para determinar a AA dos extratos obtidos por PLE, obtiveram os mesmos perfis, sendo que os valores para o ABTS foram, de forma geral, ligeiramente maiores que os obtidos pelo DPPH.

As Tabelas A.9.4 e A.9.5 mostram a Análise da Variância (ANOVA) dos resultados experimentais da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, respectivamente. Nestas tabelas é possível observar que os efeitos principais (temperatura e solvente) são estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) para ambos os métodos, entretanto, apenas para o DPPH o efeito da interação temperatura\*solvente é significativo.

Nota-se que as maiores atividades antioxidantes foram encontrados nos extratos resultantes da extração do bagaço da amora-preta utilizando a mistura hidroetanólica (50 %

v/v) nas temperaturas de 80 e 100 °C (52,1 e 68,3 µmol ET/g RF – método ABTS). Os melhores teores de compostos fenólicos também foram verificados nestas condições. Nota-se ainda que, empregando a água acidificada pH 2,5 nestas mesmas temperaturas, tem-se também altos valores de AA (51,3 e 44,0 µmol ET/g RF – método ABTS) , que não se diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos anteriores.

Observa-se que para os quatro diferentes solventes, a atividade antioxidante aumenta com a temperatura. O mesmo comportamento verificou-se em vários trabalhos empregando subprodutos de frutas como matéria-prima de extração (Ju e Howard, 2003; Ju e Howard, 2005; Howard e Pandjaitan, 2008; Wijngaard e Brunton, 2009; Monrad *et al.*, 2010). Como já relatado em seções anteriores deste trabalho, o aumento da temperatura contribuiu para aumentar o rendimento dos FT, mas o inverso aconteceu com a concentração de antocianinas. Com isso pode-se perceber que outros compostos de natureza fenólica, que não sejam as antocianinas, como as procianidinas e os ácidos fenólicos, são os principais responsáveis pelo aumento da atividade antioxidante com o aumento da temperatura. Além disso, outra explicação possível para o resultado é a formação de produtos da reação de Maillard (PRM) em altas temperaturas, que contêm potencial capacidade antioxidante, tais como carboximetilisina, hidroximetilfurfural, pentosidina, carboxietilisina, pirralina, vesperlisina A, dímero de glioxal-lisina, dímero metilglioxal-lisina, glicosepana, e presumivelmente aumentam a atividade antioxidante dos extratos obtidos em temperaturas elevadas (80 a 140 °C). Yilmaz e Toledo (2005) demonstraram que misturas de aminoácidos e açúcares aquecidas em 100 °C por 10, 20 e 30 minutos formaram PRMs (as melanoidinas) com alta capacidade antioxidante e coloração amarronzada, que se assemelham aos resultados encontrados nos experimentos de extração deste trabalho. Os presentes resultados também são consistentes com um prévio estudo realizado com espinafre, em que se obteve aumento dos valores da AA dos extratos, com solventes hidroetanólicos, em temperaturas de 50 até 190 °C. Os aumentos de AA foram correlacionados com a indução do escurecimento das amostras (Howard e Pandjaitan, 2008). Wijngaard e Brunton (2009) encontraram a máxima AA em extratos do resíduo de maçã contendo 60 % de etanol, na temperatura de 60 °C.



\* Letras maiúsculas iguais indicam que não existe diferença dos solventes dentro da mesma temperatura, ao nível de 5 % de significância pelo teste Tukey.

\*\* Letras minúsculas iguais indicam que não existe diferença das temperaturas para os mesmos solventes, ao nível de 5 % de significância pelo teste Tukey.

**Figura 5.4** – Atividade antioxidante (AA) dos extratos obtidos com líquido pressurizado expresso em  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox (ET), analisados pelo (a) método DPPH e (b) método ABTS

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS PRESENTES NOS RESÍDUOS SUBCRÍTICOS DA AMORA-PRETA

Devido à limitada disponibilidade de padrões de referência bem como a dificuldade na simultânea identificação de uma grande quantidade de compostos baseado apenas em comportamentos cromatográficos e espectro UV, a identificação e quantificação dos compostos fenólicos (antocianinas) dos extratos obtidos pela técnica PLE no presente trabalho foi realizada mediante utilização de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS).

Neste trabalho quatro antocianinas (cianidina-3-glicosídeo (C3G), cianidina-3-rutinosídeo (C3R), cianidina-3-malonil-glicosídeo (C3MG) e cianidina-3-dioxalil-glicosídeo (C3DG)) foram simultaneamente e tentativamente identificados nos extratos do resíduo da amora-preta obtidos via extração com líquido pressurizado. A identificação foi feita comparando os cromatogramas dos íons gerados com os relatados na literatura.

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC - *Ultra Performance Liquid Chromatography*) é uma importante ferramenta de detecção de analitos em nível de traços e possibilita desenvolver análises mais rápidas e com maior eficiência de separação quando comparada ao sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*). Utilizando o sistema UPLC acoplado a um espectrometro de massas, obteve-se a completa separação de quatro padrões de antocianinas dentro de 7,5 min. Em um sistema cromatográfico do tipo HPLC, a separação de antocianinas ocorre entre 40 e 60 min (Cavalcanti, 2013). Nas Figuras A.9.4, A.9.5, A.9.6 e A.9.7 podem ser visualizados os cromatogramas dos íons das antocianinas monitorados no UPLC-QToF-MS.

**Tabela 5.3** – Relação massa/carga (m/z) das antocianinas identificadas.

Nº	Composto	Massa (m/z)
1	Cianidina-3-glicosídeo	449
2	Cianidina-3-rutinosídeo	595
3	Cianidina-3-malonil-glicosídeo	535
4	Cianidina-3-dioxalil-glicosídeo	593

Como as antocianinas apresentam boa ionização do cátion flavílico (ver Figura 3.5 do Item 3.2.1.1) no modo positivo ES+, este foi o modo utilizado para analisar estes compostos. A Tabela 5.3 apresenta a relação massa/carga ( $m/z$ ) para cada antocianina identificada. Foram identificadas como antocianinas majoritárias a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo e como minoritárias a cianidina-3-malonil-glicosídeo e a Cianidina-3-dioxalil-glicosídeo. Tais resultados foram similares aos perfis antociânicos dos extratos da amora-preta *in natura* e de seus derivados obtidos via métodos convencionais já reportados na literatura (Siriwoharn *et al.*, 2004; Ferreira, Rosso e Mercadante, 2010; Kaume, Howard e Devareddy, 2011).

A Tabela 5.4 mostra a concentração das respectivas antocianinas (cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, cianidina-3-malonil-glicosídeo e cianidina-3-dioxalil-glicosídeo) presentes em cada condição realizada via procedimento PLE.

Em Anexo (Seção 9.1.4) estão as curvas padrão de cada antocianina (Figura A.9.8, A.9.9, A.9.10 e A.9.11) utilizadas para determinar as concentrações das mesmas, presentes nos extratos subcríticos, expresso em função do teor da antocianina por grama de resíduo fresco.

Foi observado que o teor de antocianinas obtidas via HPLC-DAD foi bem inferior quando comparado com os teores obtidos através das análises espectrofotométricas. A hipótese para este comportamento é que a escolha dos padrões avaliados nas análises de UPLC-QToF-MS baseou-se na composição de antocianinas previamente reportadas na amora-preta. Assim, compostos distintos às composições já reportadas, devido a processos de copigmentação com açúcares, ácidos orgânicos ou metais presentes na amostra, não podem ser detectados no HPLC-DAD devido à falta desses padrões específicos; contudo, é possível que tais compostos estejam sendo detectados colorimetricamente no espectrofotômetro UV-vis (Cavalcanti, 2013).

**Tabela 5. 4** – Concentração de compostos fenólicos antociânicos dos extratos obtidos das 12 diferentes condições por PLE.

Temp. (°C)	Solvente	C3G <sup>a</sup>	C3R <sup>b</sup>	C3MG <sup>c</sup>	C3DG <sup>d</sup>	Total <sup>e</sup>
60	Água	0,4239 ± 0,1586	0,0524 ± 0,0126	0,0095 ± 0,0079	0,0162 ± 0,0116	0,5019 ± 0,1906
60	Água pH 2,5	0,7649 ± 0,2502	0,0702 ± 0,0301	0,0214 ± 0,0001	0,0299 ± 0,0050	0,8864 ± 0,2853
60	Etanol	0,3160 ± 0,0864	0,0221 ± 0,0040	0,0118 ± 0,0019	0,0150 ± 0,0032	0,3649 ± 0,0954
60	Etanol (50 %)	0,4141 ± 0,0284	0,0272 ± 0,0007	0,0152 ± 0,0007	0,0191 ± 0,0010	0,4755 ± 0,0293
80	Água	0,4949 ± 0,2507	0,0522 ± 0,0151	0,0125 ± 0,0091	0,0190 ± 0,0126	0,5786 ± 0,2874
80	Água pH 2,5	1,0565 ± 0,3886	0,0954 ± 0,0312	0,0219 ± 0,0129	0,0371 ± 0,0180	1,2108 ± 0,4507
80	Etanol	0,2473 ± 0,0152	0,0182 ± 0,0001	0,0103 ± 0,0003	0,0132 ± 0,0008	0,2891 ± 0,0165
80	Etanol (50 %)	0,3764 ± 0,0377	0,0266 ± 0,0018	0,0138 ± 0,0011	0,0174 ± 0,0011	0,4341 ± 0,0418
100	Água	0,3458 ± 0,2239	0,0420 ± 0,0176	0,0101 ± 0,0058	0,0162 ± 0,0092	0,4141 ± 0,2566
100	Água pH 2,5	0,2701 ± 0,0170	0,0338 ± 0,0015	0,0091 ± 0,0019	0,0159 ± 0,0010	0,3289 ± 0,0155
100	Etanol	0,1786 ± 0,0097	0,0155 ± 0,0004	0,0081 ± 0,0004	0,0113 ± 0,0005	0,2135 ± 0,0110
100	Etanol (50 %)	0,3239 ± 0,0420	0,0255 ± 0,0005	0,0117 ± 0,0013	0,0164 ± 0,0011	0,3775 ± 0,0449

\*Resultados expressos pela sua média ± desvio padrão (DP).

<sup>a</sup> Teor de antocianina cianidina-3-glicosídeo (C3G) expresso em mg de antocianina (C3G) por grama de resíduo fresco.

<sup>b</sup> Teor de antocianina cianidina-3-rutinosídeo (C3R) expresso em mg de antocianina (C3R) por grama de resíduo fresco.

<sup>c</sup> Teor de antocianina cianidina-3-malonil-glicosídeo (C3MG) expresso em mg de antocianina (C3MG) por grama de resíduo fresco.

<sup>d</sup> Teor de antocianina cianidina-3-dioxalil-glicosídeo (C3DG) expresso em mg de antocianina (C3DG) por grama de resíduo fresco.

<sup>e</sup> Teor de antocianinas totais expresso em termos da soma das antocianinas C3G , C3R, C3MG e C3DG por grama de resíduo fresco.

#### **5.4 COMPARAÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO PLE COM OS MÉTODOS CONVENCIONAIS**

Com base nos resultados e nos estudos feitos empregando a técnica PLE, a condição que se considerou como a melhor, entre todas as realizadas no presente trabalho, foi a que se utilizou a mistura hidroetanólica (50 % v/v) como solvente de extração, na temperatura de 100 °C. Como já relatado, foi essa condição que obteve maiores teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante, e mesmo não sendo a que possuiu maior concentração de antocianinas monoméricas, o seu valor foi próximo ao da melhor condição para esta análise, sendo esse valor estaticamente igual ao nível de 5 % pelo teste Tukey. E ainda, em relação aos rendimentos globais, o obtido nesta condição foi o maior quando comparado com os outros valores experimentais, com exceção daqueles obtidos empregando o solvente água acidificada pH 2,5.

Assim, a condição ótima de PLE selecionada foi comparada com técnicas convencionais de extração (Maceração - utilizada para caracterizar a matéria-prima e Soxhlet) utilizando a mesma matéria-prima e o etanol e o metanol como solventes de extração. Os resultados experimentais (Tabela 5.5) demonstram que o procedimento de PLE é muito mais eficaz na extração de fitoquímicos (maior valor de  $X_0$ ) e de compostos fenólicos (FT) do resíduo da amora-preta que os realizados por procedimentos convencionais. Além disso, o extrato do PLE apresentou maior atividade antioxidante que a dos outros métodos. Estes resultados podem ser atribuídos à utilização combinada de alta pressão e temperatura durante o processo de extração por PLE. Vários autores têm demonstrado que esta combinação aumenta a extração de antocianinas e outros compostos fenólicos de diferentes fontes (Ju e Howard, 2003; Ju e Howard, 2005; Howard e Pandjaitan, 2008; Wijngaard e Brunton, 2009; Monrad *et al.*, 2010; Santos, Veggi e Meireles, 2012). Entretanto, como pode se ver na Tabela 5.5, o menor teor de antocianinas foi para o que empregou a técnica PLE. Acredita-se que esta contradição está relacionada com o procedimento operacional de extração em conjunto com o efeito deletério da temperatura sobre as antocianinas, uma vez que temos que a maceração foi realizada em temperatura ambiente, a extração Soxhlet em temperatura em torno de 40 °C e a PLE a 100 °C.

Como no presente trabalho, Monrad *et al.*, (2010) também não encontrou diferença significativa na composição dos extratos obtidos pela extração convencional utilizando o metanol e o etanol como solventes extrator. Isso possivelmente acontece, pelo fato destes solventes possuírem polaridade bastante parecida, 5,1 e 5,2, respectivamente.

De maneira geral, comportamentos semelhantes, quando se comparou a técnica PLE com as convencionais, foram encontrados nos estudos realizados por Wijngaard e Brunton, (2009) e Ju e Howard (2003), em que trabalharam com resíduo de maçã e uva, como matéria-prima da extração.

**Tabela 5. 5** – Resultados obtidos das extrações convencionais e da melhor condição da extração com líquido pressurizado a partir do bagaço da amora-preta.

Métodos	FT <sup>a</sup>	AM <sup>b</sup>	Atividade Antioxidante <sup>c</sup>		X <sub>0</sub> <sup>d</sup>
			DPPH	ABTS	
Maceração	3,66 ± 0,05 <sup>A</sup>	1,21 ± 0,02 <sup>AB</sup>	29,04 ± 2,18 <sup>A</sup>	46,09 ± 1,15 <sup>A</sup>	5,02 ± 0,07 <sup>A</sup>
Soxhlet Metanol	4,64 ± 0,01 <sup>A</sup>	1,33 ± 0,01 <sup>AB</sup>	39,55 ± 2,87 <sup>B</sup>	60,19 ± 3,30 <sup>B</sup>	5,25 ± 0,17 <sup>A</sup>
Soxhlet Etanol	4,10 ± 0,71 <sup>A</sup>	1,68 ± 0,23 <sup>B</sup>	42,79 ± 1,19 <sup>B</sup>	63,10 ± 4,58 <sup>B</sup>	5,51 ± 0,27 <sup>A</sup>
PLE	7,36 ± 0,09 <sup>B</sup>	1,02 ± 0,05 <sup>A</sup>	76,03 ± 0,52 <sup>C</sup>	68,28 ± 1,34 <sup>B</sup>	6,23 ± 0,02 <sup>B</sup>

\* Resultados expressos pela sua média ± desvio padrão (DP).

\*\* Letras maiúsculas iguais indicam que não existe diferença entre os métodos de extração, ao nível de 5 % de significância pelo teste Tukey.

<sup>a</sup> Teor de compostos fenólicos totais expresso em equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de resíduo fresco.

<sup>b</sup> Teor de antocianinas monoméricas totais expressas em equivalente de cianidina-3-glicosídeo (EC3G) por grama de resíduo fresco.

<sup>c</sup> Atividade antioxidante expresso em µmol de equivalente Trolox (ET) por grama de resíduo fresco.

<sup>d</sup> Rendimento global de extração expresso em porcentagem (g extrato seco/g resíduo fresco).

## 5.5 CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO

A Figura 5.5 mostra as curvas globais de extração (OEC) realizadas na melhor condição de extração da PLE (T = 100 °C e mistura hidroetanólica como solvente extrator) nas vazões de 1,67; 3,35 e 6,70 mL/min. Os dados experimentais obtidos para a construção das curvas estão disponíveis nas Tabelas A.9.6, A.9.7 e A.9.8.

Para as condições estudadas, verificou-se (Figura 5.5) que com a diminuição da vazão teve-se um aumento no rendimento acumulado (%). Fato esse diferente ao esperado, já que

a literatura diz que o aumento da vazão faz aumentar a taxa de transferência de massa, devido ao aumento da velocidade superficial, e assim conseqüentemente aumentar a massa acumulada (Pronyk e Mazza, 2009; Wiboonsirikul e Adachi, 2008). Dessa forma, o que sugere-se para está explicando os resultados do presente trabalho, é que com a diminuição da vazão, o solvente penetra de forma mais eficiente no interior da matriz vegetal, por passar por está mais lentamente, aumentando assim a transferência de massa (TM) por difusão e a solubilidade dos compostos e conseqüentemente elevando o rendimento. Além disso, acredita-se também que a explicação pode está relacionado com o procedimento operacional das extrações. Para a vazão de 1,67 mL/min verificou-se que o sistema demorou um pouco mais de 15 minutos para atingir a pressão de operação de trabalho (75 bar), isso porque realmente num fluxo menor de solvente a célula extratora demora um pouco mais pra ser totalmente preenchida, ficando assim a matriz vegetal mais tempo em contato com o solvente e sob a temperatura de 100 °C, contribuindo para uma maior solubilidade dos compostos. O contrário foi observado na vazão de 6,70 mL/min.

Verifica-se ainda na Figura 5.5 que, para as três vazões em estudo, até o tempo em torno de 30 minutos tem-se um aumento expressivo do acúmulo de massa, e depois desse tempo o rendimento começa a se estabilizar. Dessa maneira, visualmente é possível afirmar que este é o tempo ( $t_{CER}$ ) que caracteriza o período em que a extração dos solutos ocorre predominantemente através da transferência de massa por convecção. Esse período é caracterizado por uma taxa de extração constante (CER – *constant extraction rate*) dos analitos. A duração desse período ( $t_{CER}$ ) está de acordo com o tempo de extração pré-estabelecido para a realizações das extrações PLE. Além disso, também é possível verificar na Figura 5.5 que, entre o tempo de 30 a 90 minutos (período FER – *falling extraction rate*), há um decréscimo da taxa de transferência de massa (TM), que é resultado da diminuição da área efetiva de TM. Nessa etapa, tanto a transferência de massa por convecção quanto por difusão são importantes na extração. E, aproximadamente a partir de 90 minutos, o rendimento global acumulado (%) tende a se estabilizar, porque nesse período (DC – *diffusion controlled period*) a retirada de solutos é realizada, predominantemente, pelo mecanismo de difusão. Nesta etapa não há quase nenhum soluto na superfície da partícula sólida (Brunner, 1994; Vasconcellos, 2007). Nota-se ainda que em 120 min de extração o rendimento é maior do que para o tempo adotado de 30 min. Por

exemplo, na vazão de 1,67 mL/min há um aumento de 6 % para, aproximadamente, 9 %. Isso é interessante para o processo, podendo o rendimento ser ainda maior se comparado às técnicas convencionais, que demandam tempos de extração muito mais elevados. E por fim, pode-se verificar na Figura 5.5 que dentre as vazões trabalhadas a mais interessante seria a de 1,67 mL/min, já que nesta se gasta uma menor quantidade de solvente no processo de extração e, conjuntamente, é nela que se observa um maior rendimento global em todos os tempos avaliados.

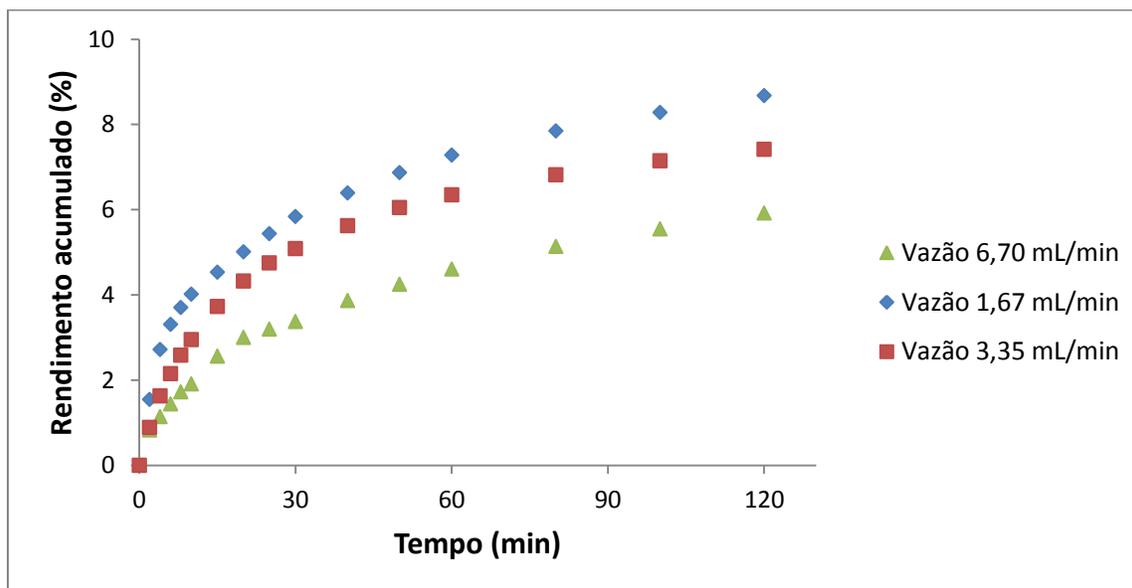


Figura 5. 5 – Curvas globais de extração em diferentes vazões.

Um estudo um pouco mais detalhado, como a realização de ajustes dos dados experimentais é interessante a ser feito para poder está determinando alguns parâmetros cinéticos, como a taxa de transferência de massa ( $M_{CER}$ ), a duração do período CER ( $t_{CER}$ ), o rendimento durante o período CER ( $R_{CER}$ ) e a razão mássica de soluto na fase fluida na saída do extrator ( $Y_{CER}$ ), e dessa forma está tentando concretizar mais a explicação dos resultados.



## **6. CONCLUSÕES**

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho as seguintes conclusões podem ser elencadas:

- A composição centesimal do resíduo da polpa a amora-preta demonstrou que a mesma é uma matéria-prima com alto teor de carboidratos, fibras, proteínas e composto biotativos (fenólicos) constituindo em uma boa fonte calórica e alimentícia o que possibilita sua potencial aplicação na indústria alimentícia, como também na indústria química, farmacêutica e de cosméticos.

- Os extratos obtidos via extração com líquido pressurizado, Soxhlet e maceração apresentaram bons rendimentos globais de extração bem como de compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante de forma que todos os extratos possuem potencial aplicação como corantes e/ou extratos antioxidantes naturais nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Com relação à escolha dos solventes utilizados observou-se que a mistura hidroetanólica (50 % de etanol) apresentou comportamento diferenciado em relação aos outros solventes (água pura, etanol puro e água acidificada pH 2,5), apresentando maiores concentrações de compostos fenólicos totais (FT), atividade antioxidante (AA), bons rendimentos globais ( $X_0$ ) e boas concentrações de antocianinas monoméricas totais (AM) a maiores temperaturas (80 e 100 °C). Como segunda melhor opção dos solventes extratores trabalhados sugere-se a água acidificada pH 2,5 já que seus extratos possuíram resultados não tão altos como os da mistura hidroetanólica, mas um pouco acima dos obtidos pela água e etanol puro, sendo os valores destes últimos na sua maioria estatisticamente iguais. Em geral, observou-se que o aumento da temperatura de 60 para 100 °C resultou em melhores valores das variáveis respostas, com exceção da AM, em que se observou uma leve diminuição, acredita-se que isso deve ao efeito deletério da mesma sobre as antocianinas.

- A análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada por espectrometria de massa UPLC-QToF-MS mostrou que as antocianinas presentes em maior quantidade do resíduo da amora-preta são a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo e as minoritárias são a cianidina-3-malonil-glicosídeo e a cianidina-3-dioxalil-glicosídeo.

- Diante dos resultados obtidos na caracterização química dos extratos e dos valores de  $X_0$  e nos estudos feitos empregando a técnica PLE, a condição que se considerou como a melhor, de todas as realizadas no presente trabalho, foi a que se utilizou a mistura hidroetanólica (50 % v/v) como solvente de extração, na temperatura de 100 °C. As variáveis repostas nesta condição obtiveram os seguintes valores: FT = 7,36 EAG/g RF, AM = 1,02 EC3G/g RF, DPPH = 76,03 ET/g RF, ABTS = 68,28 ET/g RF e  $X_0 = 6,33$  %. Comparando estes valores com os obtidos pelas técnicas convencionais (Soxhlet e maceração), em geral estes foram maiores e estaticamente diferentes. Isso demonstra que a técnica PLE pode ser uma alternativa promissora às técnicas convencionais de extração de compostos antioxidantes.

- As OEC's, realizadas na melhor condição da PLE, mostraram que até o tempo em torno de 30 minutos há um aumento expressivo do acúmulo de massa, e depois desse tempo ( $t_{CER}$ ) o rendimento começa a ficar aproximadamente constante. Os períodos CER, FER e DC foram caracterizados pelos seguintes intervalos de tempo: 0-30 min, 30-90 min e acima de 90 min, respectivamente.

- Por fim, pode-se concluir que vazões baixas são mais interessantes de se trabalhar quando se emprega mistura de etanol e água (50 % v/v) em altas temperaturas (100 °C) via procedimento PLE.

## **7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Avaliar a utilização dos processos de extração com líquido pressurizado utilizando diferentes proporções de etanol em água e diferentes valores de pH a fim de investigar o seu efeito no rendimento global de extração e nos compostos de interesse dos extratos obtidos;
- Realizar experimentos de aumento de escala a fim de validar o critério de aumento de escala em que se considera a melhor condição de extração pela técnica PLE, em vazões menores;
- Estudo de viabilidade econômica da produção dos extratos, através da análise de custos de instalações e manufatura;
- Investigar a influência dos processos de hidrólise na composição química dos extratos PLE;
- Realizar experimentos de análise de atividade antioxidante mais detalhada como ORAC e método *in vitro* a fim de avaliar a disponibilidade dos compostos antioxidantes;
- Formar partículas com os extratos antociânicos obtidos da melhor condição de extração, uma vez que se sabe que as antocianinas são compostos altamente instáveis às condições ambientais (temperatura, oxigênio, umidade, etc);
- Fazer um estudo mais detalhado das OEC's, com a realização de ajuste de modelos matemáticos de transferência de massa aos dados experimentais para determinar alguns parâmetros cinéticos.



## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDILLE, M. H. et al. **Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits.** Food Chemistry, v. 90, n. 4, p. 891-896, 2005.

ADAMS, J. B.; ONGLEY, M. H. **The degradation of anthocyanins in canned strawberries.** International Journal of Food Science & Technology, v. 8, n. 2, p. 139-145, 1973.

ANTUNES, L. E.; RASEIRA, M. C. B. **Aspectos Técnicos da Cultura da Amora-preta.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado (Documento, 122) p. 54, 2004.

ANTUNES, L. E. C. **Amora-preta: nova opção de cultivo no brasil.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 32, p. 151-158, 2002.

ANTUNES, L. E. C. et al. **Blossom and ripening periods of blackberry varieties in Brazil.** Journal American Pomological Society, v. 54, n. 4, p. 164-168, 2000.

ANTUNES, L. E. C.; FILHO, J. D.; SOUZA, C. M. **Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 38, n. 3, p. 413-419, 2003.

ARAÚJO, P. F. D. **Atividade antioxidante de néctar de amora-preta (*Rubus spp.*) e sua influência sobre os lipídios séricos, glicose sanguínea e peroxidação lipídica em hamsters (*Mesocricetus auratus*) hipercolesterolêmicos.** 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

AYBASTIER, Ö. et al. **Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology.** Industrial Crops and Products, v. 44, n. 0, p. 558-565, 2013.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. **Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** Food Chemistry, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** Rev. Nutr., v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOARI LIMA, A. D. J. et al. **Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora Berg*) e de suas frações.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v. 58, p. 416-421, 2008.

BONDRE, S. et al. **Study on isolation and purification of anthocyanins and its application as pH indicator.** International Journal of Advanced Biotechnology and Research v. 3, n. 3, p. 698-702, 2012.

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

BROUILLARD, R.; DUBOIS, J.-E. **Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media.** Journal of American Chemistry Society, v. 99, n. 5, p. 1359-1363, 1977.

- BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. STEINKOPFF, D. New York : Springer, 1994.
- CAMEL, V. **Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls**. *Analyst*, v. 126, n. 7, p. 1182-1193, 2001.
- CARABIAS-MARTÍNEZ, R. et al. **Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples**. *Journal of Chromatography A*, v. 1089, n. 1-2, p. 1-17, 2005.
- CASTRO, M. D. L.; GARCÍA-AYUSO, L. E. **Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future**. *Analytica Chimica Acta*, v. 369, n. 1-2, p. 1-10, 1998.
- CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. **Soxhlet extraction: past and present panacea**. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 16, p. 2383-2389, 2010.
- CAVALCANTI, R. N. **Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática**. 2013. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- CHIM, J. F. **Caracterização de compostos bioativos em amora-preta (*Rubus sp.*) e sua estabilidade no processo e armazenamento de geléias convencional e *light***. 2008. Tese de Doutorado. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- DING, M. et al. **Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity**. *J Biol Chem*, v. 281, n. 25, p. 17359-68, 2006.
- FACCHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; SANTOS, A. M. **Amoreira-preta, framboesa e mirtilo: pequenos frutos para o sul do Brasil**. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 13, 1994. Anais: Sociedade Brasileira de Fruticultura. 3: p. 989-990, 1994.
- FACHINELLO, J. C. **Mirtilo**. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 30: p. 285-576, 2008.
- FERREIRA, D. S. **Compostos bioativos em amora-preta e encapsulação do seu extrato antociânico por gelificação térmica com curdlana**. 2008. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- FERREIRA, D. S.; ROSSO, V. V. D.; MERCADANTE, A. Z. **Compostos Bioativos Presentes Em Amora-Preta (*Rubus spp.*)**. *Rev. Bras. Frutic.*, v. 32, n. 3, p. 664-674, 2010.
- FRANCIS, F. J. **Food colorants: anthocyanins**. *Crit Rev Food Sci Nutr*, v. 28, n. 4, p. 273-314, 1989.
- FRANCIS, F. J. **Anthocyanins and betalains: composition and applications**. *Cereal foods world.*, v. 45, n. 5, p. 208-213, 2000.
- GALVÃO, E. L. **Extração do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus j.* com CO<sub>2</sub> pressurizado**. 2004. Dissertação de Mestrado. 2004. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

- GARCÍA-MARINO, M. et al. **Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction.** *Analytica Chimica Acta*, v. 563, n. 1–2, p. 44-50, 2006.
- GHOSH, D.; KONISHI, T. **Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function.** *Asia Pac J Clin Nutr*, v. 16, n. 2, p. 200-8, 2007.
- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. **Characterization and measurement of anthocyanins by uv-visible spectroscopy.** In: (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- HE, J.; GIUSTI, M. M. **Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties.** *Annu Rev Food Sci Technol*, v. 1, p. 163-87, 2010.
- HIRSCH, G. E. et al. **Caracterização físico-química de variedades de amora-preta da região sul do Brasil.** *Ciência Rural*, v. 42, p. 942-947, 2012.
- HOWARD, L.; PANDJAITAN, N. **Pressurized Liquid Extraction of Flavonoids from Spinach.** *Journal of Food Science*, v. 73, n. 3, p. 151-157, 2008.
- IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. **A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables.** *Food Chemistry*, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.
- ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. **Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms.** *Free Radic Biol Med*, v. 30, n. 4, p. 433-46, 2000.
- JACKMAN, R. L. et al. **Anthocyanins as food colorants - a review.** *Journal of Food Biochemistry*, v. 11, n. 3, p. 201-247, 1987.
- JACQUES, A. C. et al. **Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy.** *Química Nova*, v. 33, n. 8, p. 1720-1725, 2010.
- JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C. **Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus spp*).** *Semina: Ciências Agrárias* v. 32, n. 1, p. 245-260, 2011.
- JEPSON, R. G.; CRAIG, J. C. **The American heritage science dictionary.** North America: Houghton Mifflin Company, 2005.
- JU, Z.; HOWARD, L. R. **Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin.** *Journal of Food Science*, v. 70, n. 4, p. 270-276, 2005.
- 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.
- KARAKAYA, S. **Bioavailability of phenolic compounds.** *Crit Rev Food Sci Nutr*, v. 44, n. 6, p. 453-64, 2004.

- KAUME, L.; HOWARD, L. R.; DEVAREDDY, L. **The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 60, n. 23, p. 5716-5727, 2011.
- KECHINSKI, C. P. **Estudo de diferentes formas de processamento do mirtilo visando à preservação dos compostos antociânicos.** 2011. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- KHANAL, R. C.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. **Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins.** Food Research International, v. 43, n. 5, p. 1464-1469, 2010.
- KHUWIJTJARU, P. et al. **Kinetics on the hydrolysis of fatty acid esters in subcritical water.** Chemical Engineering Journal, v. 99, n. 1, p. 1-4, 2004.
- KING, A. M. Y.; YOUNG, G. **Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals.** Journal of the American Dietetic Association, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.
- KING, J. W.; GRABIEL, R. D. **Isolation of polyphenolic compounds from fruits or vegetables utilizing subcritical water extraction.** United States, 2007.
- KOSSEVA, M. R. **Chapter 3: Processing of food wastes.** In: STEVE, L. T. (Ed.). Advances in Food and Nutrition Research: Academic Press, v.58, p.57-136, 2009.
- KWIATKOWSKI, A. et al. **Avaliações químicas da polpa e resíduo da polpa de amora-preta orgânica, cv. Tupy.** Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos, v. 1, n. 1, p. 43-45, 2010.
- LAMOOLPHAK, W. et al. **Hydrothermal decomposition of yeast cells for production of proteins and amino acids.** Journal of Hazardous Materials, v. 137, n. 3, p. 1643-1648, 2006.
- LAZZE, M. C. et al. **Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines.** Carcinogenesis, v. 25, n. 8, p. 1427-33, 2004.
- LI, H. et al. **Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines.** Food Chemistry, v. 112, n. 2, p. 454-460, 2009.
- LORENZI, H. et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo *in natura*.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006.
- LOU, X.; JANSSEN, H.-G.; CRAMERS, C. A. **Parameters affecting the accelerated solvent extraction of polymeric samples.** Analytical Chemistry, v. 69, n. 8, p. 1598-1603, 1997.
- LUTHRIA, D. L. **Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor.** Food Chemistry, v. 107, n. 2, p. 745-752, 2008.
- LUTZ, I. A. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005.
- MAAS, J. L.; GALLETTA, G. J.; STONER, G. D. **Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberry: a review.** HortScience, v. 26, n. 1, p. 10-14, 1991.

- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. D. **Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 25, n. 4, p. 659 – 664, 2005.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. D. **Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade.** Boletim do CEPPA, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.
- MARTÍNEZ, J. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO<sub>2</sub> supercrítico: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos.** 2005. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MELECCHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* l: estudo comparativo de métodos de extração.** 2005. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MENDIOLA, J. A. et al. **Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications.** Journal of Chromatography A, v. 1152, n. 1–2, p. 234-246, 2007.
- MONRAD, J. K. et al. **Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 5, p. 2862-2868, 2010
- MOORE, J. N. **Blackberry breeding.** HortScience, v. 19, n. 2, p. p.183-185, 1984.
- MOTA, R. V. **Caracterização física e química de geléia de amora-preta.** Ciência Tecnologia Alimentos, v. 26, n. 3, p. 539-546, 2006.
- MOURE, A. et al. **Natural antioxidants from residual sources.** Food Chemistry, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.
- MUSTAFA, A.; TURNER, C. **Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: a review.** Analytica Chimica Acta, v. 703, n. 1, p. 8-18, 2011.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. **Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 41, n. 5, p. 1523-1542, 2006.
- NELSON, P. E.; TRESSLER, D. K. **Fruit and vegetable juice processing technology.** 3. Westport: AVI, 603, 1980.
- NILE, S. H.; PARK, S. W. **Edible berries: review on bioactive components and their effect on human health.** Nutrition, n. 0, 2013.
- OLIVEIRA, D. A. D. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades merlot e syrah.** 2010. Dissertação de Mestrado. Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- PAREDES-LÓPEZ, O. et al. **Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life - a review.** Plant Foods Hum Nutr, v. 65, p. 299–308, 2010.
- PARR, A. J.; BOLWELL, G. P. **Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 80, n. 7, p. 985-1012, 2000.

- PATRAS, A. et al. **Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation.** Trends in Food Science & Technology, v. 21, n. 1, p. 3-11, 2010.
- PERTUZATTI, P. B. **Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* reade).** 2009. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- POLING, E. B. **Blackberries.** Journal of Small Fruit and Viticulture v. 14, n. 1-2, p. 38-69, 1996.
- PRONYK, C.; MAZZA, G. **Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts.** Journal of Food Engineering, v. 95, n. 2, p. 215-226, 2009.
- RAMOS, L.; KRISTENSON, E. M.; BRINKMAN, U. A. T. **Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis.** Journal of Chromatography A, v. 975, n. 1, p. 3-29, 2002..
- RASEIRA, A.; SANTOS, A. M.; RASEIRA, M. C. B. **Caingangue, nova cultivar de amoreira-preta para consumo 'in natura'.** HortiSul, v. 2, n. 3, p. 11-12, 1992.
- RASEIRA, M. C. B.; SANTOS, A. M.; MADAIL, J. C. M. **Amora preta: cultivo e utilização.** Pelotas : EMBRAPA. CNPFT: 20 p. 1984.
- RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. **Extraction, Isolation, and purification of anthocyanins.** In: (Ed.). Current Protocols in Food Analytical Chemistry: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- ROUTRAY, W.; ORSAT, V. **Blueberries and their anthocyanins: factors affecting biosynthesis and properties.** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 10, n. 6, p. 303-320, 2011.
- RUFINO, M. D. S. M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>+</sup>.** Embrapa - Comunicado Técnico 128. Fortaleza, CE: 4 p. 2007a.
- RUFINO, M. D. S. M. et al.. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH.** Embrapa - Comunicado Técnico 127. Fortaleza, CE: 1-4 p. 2007b.
- SANTIAGO, M. C. P. D. A. **Avaliação via cromatografia líquida de alta eficiência do efeito da microfiltração do suco da amora-preta (*Rubus Spp.*) sobre a composição de suas antocianinas majoritárias.** 2010. Dissertação de Mestrado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. **Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jaboticaba skins.** Journal of Food Engineering, v. 108, n. 3, p. 444-452, 2012.
- SANTOS, D. T. D. **Extração, micronização e estabilização de pigmentos funcionais: construção de uma unidade multipropósito para desenvolvimento de processos com fluidos**

**pressurizados**. 2011. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SEERAM, N. P. et al. **Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro***. J Agric Food Chem, v. 54, n. 25, p. 9329-39, 2006.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. **Phenolic compounds and antioxidant capacity of georgia-grown blueberries and blackberries**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, n. 8, p. 2432-2438, 2002.

SERRAINO, I. et al. **Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure**. Life Sci, v. 73, n. 9, p. 1097-114, 2003.

SILVA, M. C. **Aproveitamento do resíduo do despulpamento da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) para obtenção de pigmento com propriedades funcionais**. 2012. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

SIMPSON, K. L. **Chemical changes in natural food pigments**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1985.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent**. In: LESTER, P. (Ed.). Methods in Enzymology: Academic Press, v. 299, p.152-178, 1999.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents**. American Journal of Enology and Viticulture, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SIRIWOHARN, T. et al. **Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus l. hybrids*) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 52, n. 26, p. 8021-8030, 2004.

SOUSA, M. B. et al. **Amora - qualidade pós-colheita**. Divulgação AGRO 556 p.4-8, 2007.

SOUZA, A. C. P. et al. **Aproveitamento de resíduos sólidos do processamento do suco de mirtilo para uso como corante funcional na indústria de alimentos**. Porto Alegre, 2010. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10183/45524> >. Acesso em: 09/10/2013.

STOCLET, J. C. et al. **Vascular protection by dietary polyphenols**. Eur J Pharmacol, v. 500, n. 1-3, p. 299-313, 2004.

TATE, P. et al. **Blackberry extracts inhibit UV-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA100**. Nutrition Research, v. 26, n. 2, p. 100-104, 2006

VASCONCELLOS, C. M. C. D. **Extração supercrítica dos óleos voláteis de *Achyrocline satureioides* (Macela) e *Vetiveria zizanioides* (Vetiver): determinação da cinética de extração e estimativa de custos de manufatura**. 2007. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VATAI, T.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž. **Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide.** Journal of Food Engineering, v. 90, n. 2, p. 246-254, 2009.

VIZZOTTO, M. **Sistema de Produção da amoreira-preta.** Embrapa Clima Temperado, 2008. Disponível em: <  
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amora/SistemaProducaoAmoreiraPreta/caracteristicas.htm> >. Acesso em: 01/10/2013.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. **Amora-preta (*Rubus sp.*): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes.** Rev. Bras. Frutic., v. 33, n. 4, p. 1209-1214, 2011.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. **Phenolic acid profiles in some small berries.** J Agric Food Chem, v. 53, n. 6, p. 2118-24, 2005.

ZEN, F. G. **Estudo da secagem convectiva do bagaço de mirtilo visando minimizar a perda de compostos antociânicos.** 2010. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WANG, S. Y.; JIAO, H. **Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen.** J Agric Food Chem, v. 48, n. 11, p. 5677-84, 2000.

WANG, S. Y. et al. **Ellagic acid content in small fruits, mayhaws, and other plants.** Journal of small fruit & viticulture., v. 2, n. 4, p. 39-49, 1994.

WANG, W.-D.; XU, S.-Y. **Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate.** Journal of Food Engineering, v. 82, n. 3, p. 271-275, 2007.

WIBOONSIRIKUL, J.; ADACHI, S. **Extraction of functional substances from agricultural products or by products by subcritical water treatment.** Food Science and Technology Research, v. 14, n. 4, p. 319-328, 2008.

WIJNGAARD, H.; BRUNTON, N. **The optimization of extraction of antioxidants from apple pomace by pressurized liquids.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, n. 22, p. 10625-10631, 2009..

WIJNGAARD, H. et al. **Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin.** Food Research International, v. 46, n. 2, p. 505-513, 2012.

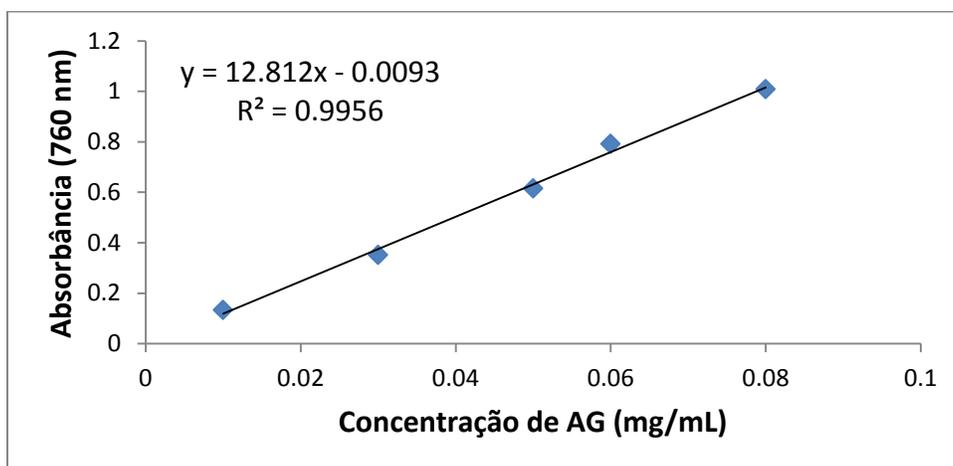
WIJNGAARD, H. H.; BALLAY, M.; BRUNTON, N. **The optimisation of extraction of antioxidants from potato peel by pressurised liquids.** Food Chemistry, v. 133, n. 4, p. 1123-1130, 2012.

Yilmaz, Y.; Toledo, R. **Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products.** Food Chem. v. 93, n. 2, p. 273-278, 2005.

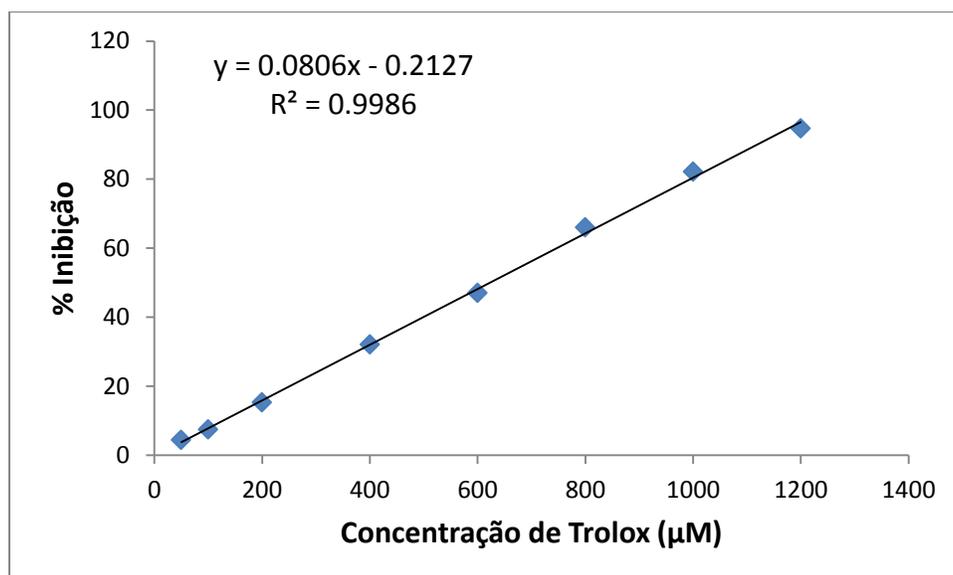
## 9. ANEXOS

### 9.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

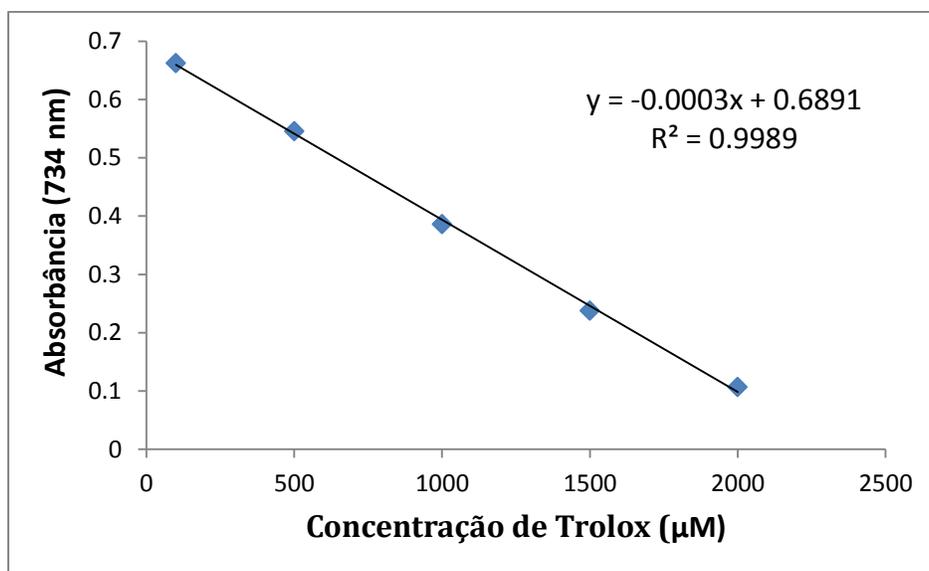
#### 9.1.1 Curvas Padrões



**Figura A.9. 1** – Curva padrão de ácido gálico (AG) obtida da absorbância em 760 nm *versus* a concentração de AG (mg/mL).



**Figura A.9. 2** – Curva padrão de Trolox obtida da % Inibição (PI) *versus* concentração de Trolox ( $\mu\text{M}$ ) para se determinar a atividade antioxidante pelo método DPPH.



**Figura A.9. 3** – Curva padrão de Trolox obtida da absorbância em 734 nm *versus* concentração de Trolox (μM) para se determinar a atividade antioxidante pelo método ABTS.

### 9.1.2 Análises de Variância (ANOVA)

**Tabela A.9. 1** – Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o rendimento global de extração  $X_0$  (%) das extrações por PLE.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	<i>p</i> -valor*
Temperatura	2	22,289	11,144	38,729	0,0000
Solvente	3	384,024	128,008	444,855	0,0000
Temperatura*Solvente	6	3,544	0,591	2,053	0,1362
Erro	12	3,453	0,288		

\* Efeito significativo ( $p < 0,05$ ). GL = Graus de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = Quadrados médios; F = valor de  $F_{\text{calculado}}$  e *p*-valor = probabilidade.

**Tabela A.9. 2** – Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o teor de fenólicos totais (FT) das extrações por PLE.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	<i>p</i> -valor*
Temperatura	2	20,491	10,245	44,046	0,0000
Solvente	3	23,334	7,778	33,439	0,0000
Temperatura*Solvente	6	4,926	0,821	3,530	0,0300
Erro	12	2,791	0,233		

\* Efeito significativo ( $p < 0,05$ ). GL = Graus de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = Quadrados médios; F = valor de  $F_{\text{calculado}}$  e *p*-valor = probabilidade.

**Tabela A.9. 3** – Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre a concentração das antocianinas monoméricas (AM) das extrações por PLE.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	<i>p</i> -valor*
Temperatura	2	0,648	0,324	44,259	0,0000
Solvente	3	0,974	0,325	44,334	0,0000
Temperatura*Solvente	6	0,250	0,042	5,683	0,0053
Erro	12	0,088	0,007		

\* Efeito significativo ( $p < 0,05$ ). GL = Graus de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = Quadrados médios; F = valor de  $F_{\text{calculado}}$  e *p*-valor = probabilidade.

**Tabela A.9. 4** – Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre a atividade antioxidante, pelo método DPPH, das extrações por PLE.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	<i>p</i> -valor*
Temperatura	2	2926,872	1463,436	205,299	0,0000
Solvente	3	2378,643	792,881	111,230	0,0000
Temperatura*Solvente	6	655,245	109,208	15,320	0,0001
Erro	12	85,540	7,128		

\* Efeito significativo ( $p < 0,05$ ). GL = Graus de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = Quadrados médios; F = valor de  $F_{\text{calculado}}$  e *p*-valor = probabilidade.

**Tabela A.9. 5** – Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre a atividade antioxidante, pelo método ABTS, das extrações por PLE.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b><i>p</i>-valor*</b>
Temperatura	2	892,583	446,292	14,607	0,0006
Solvente	3	2331,525	777,175	25,437	0,0000
Temperatura*Solvente	6	436,037	72,673	2,379	0,0950
Erro	12	366,631	30,553		

\* Efeito significativo ( $p < 0,05$ ). GL = Graus de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = Quadrados médios; F = valor de  $F_{\text{calculado}}$  e *p*-valor = probabilidade.

### 9.1.3 Cromatogramas dos íons das antocianinas analisadas via UPLC-MS

Abaixo estão separadamente os cromatogramas dos íons das 4 antocianinas identificadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massa (UPLC-MS).

antocianonas  
Amora natural a 578 (2.255)

1: TOF MS ES+  
7.83e5

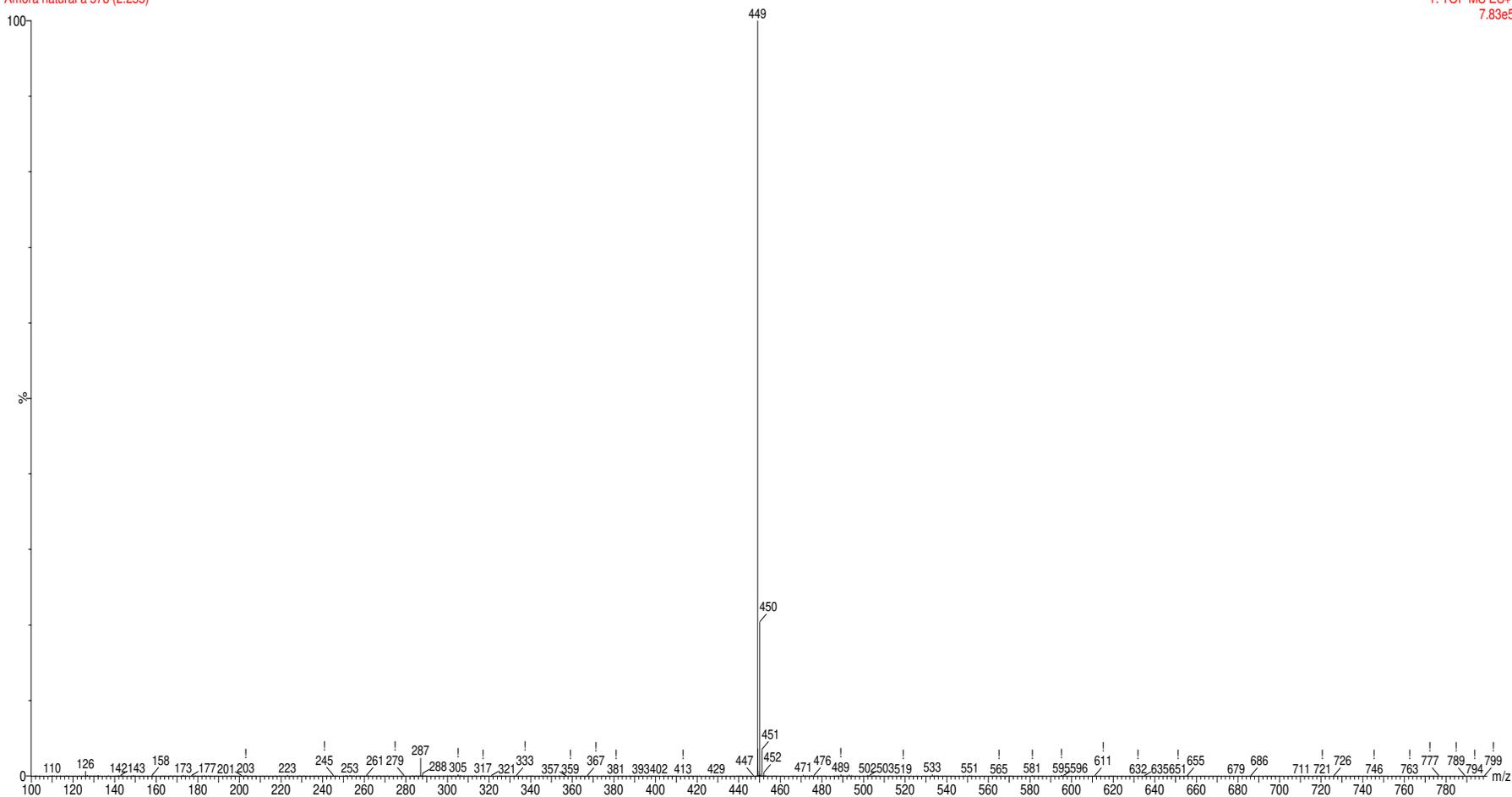


Figura A.9. 4 – Cromatograma do íon da antocianina Cianidina-3-glucosídeo (majoritária) de massa = 449 (m/z).

## antocianionas

Amora natural a 1242 (4.826)

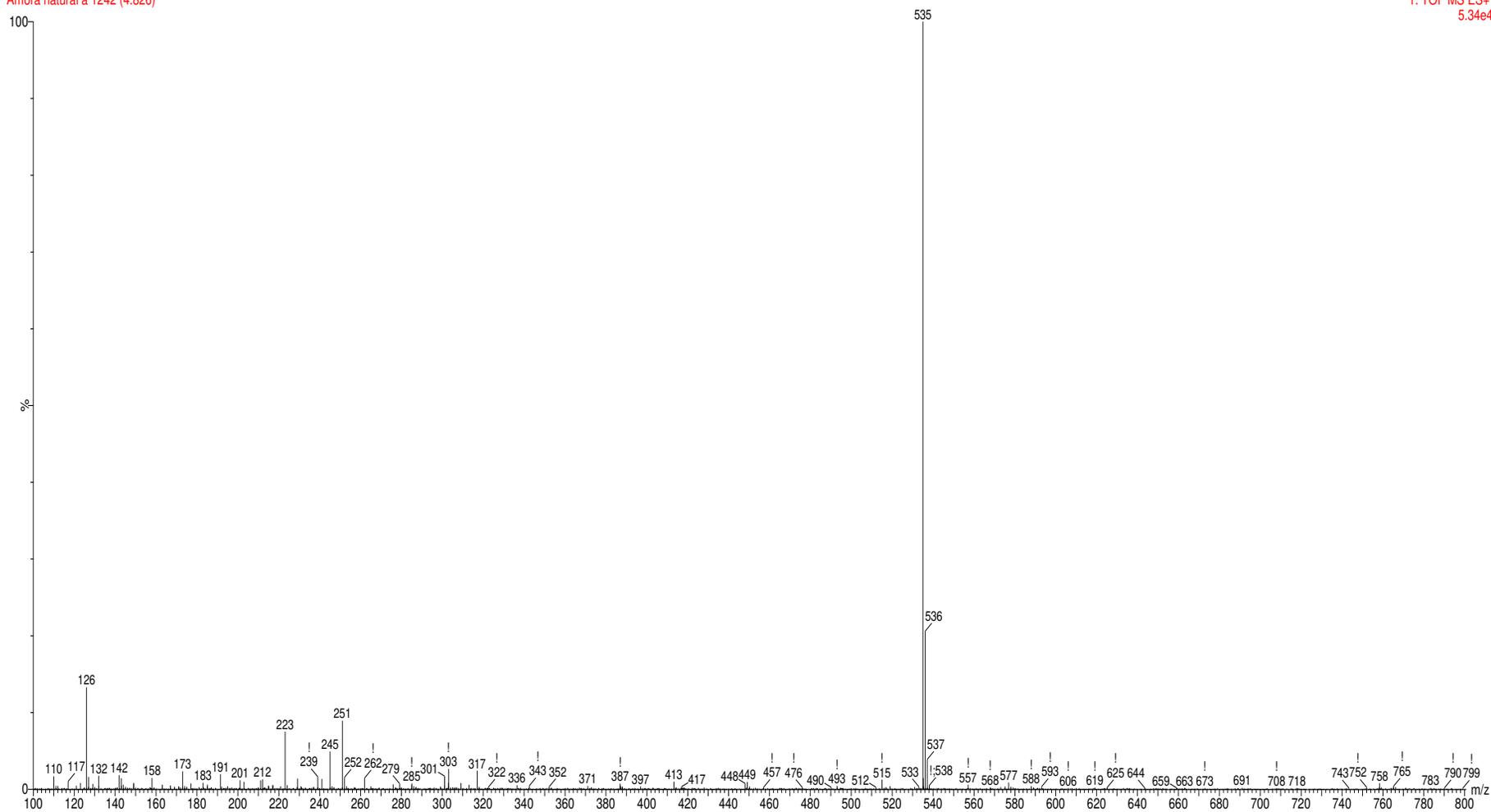
1: TOF MS ES+  
5.34e4

Figura A.9.5 – Cromatograma do íon da antocianina Cianidina-3-malonil-glicosídeo (minoritária) de massa = 535 (m/z).

## antocianonas

Amora natural a 1346 (5.226)

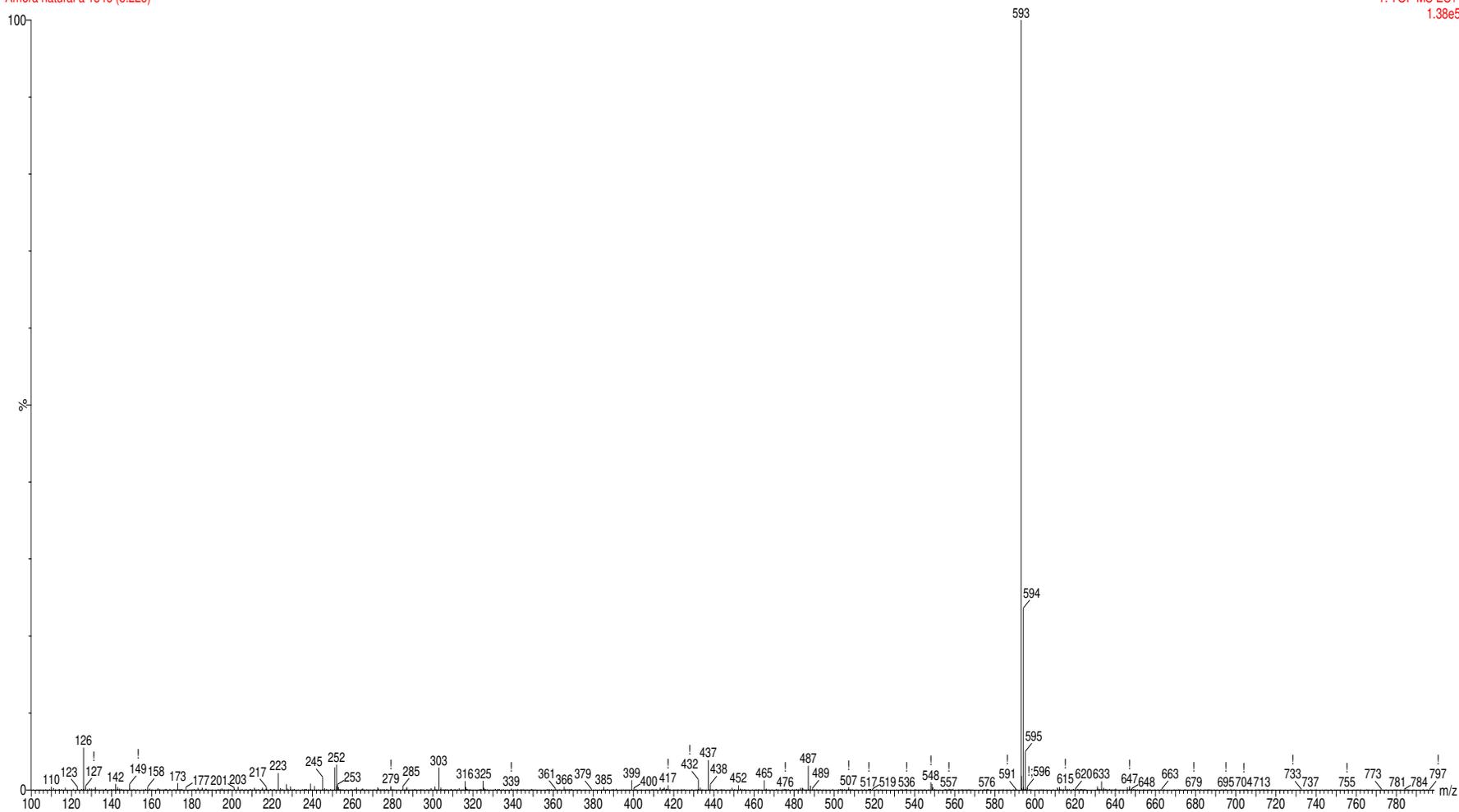
1: TOF MS ES+  
1.38e5

Figura A.9. 6 – Cromatograma do íon da antocianina Cianidina-3-dioxalil-glicosídeo (minoritária) de massa = 593 (m/z).

## antocianionas

Amora natural a 728 (2.838)

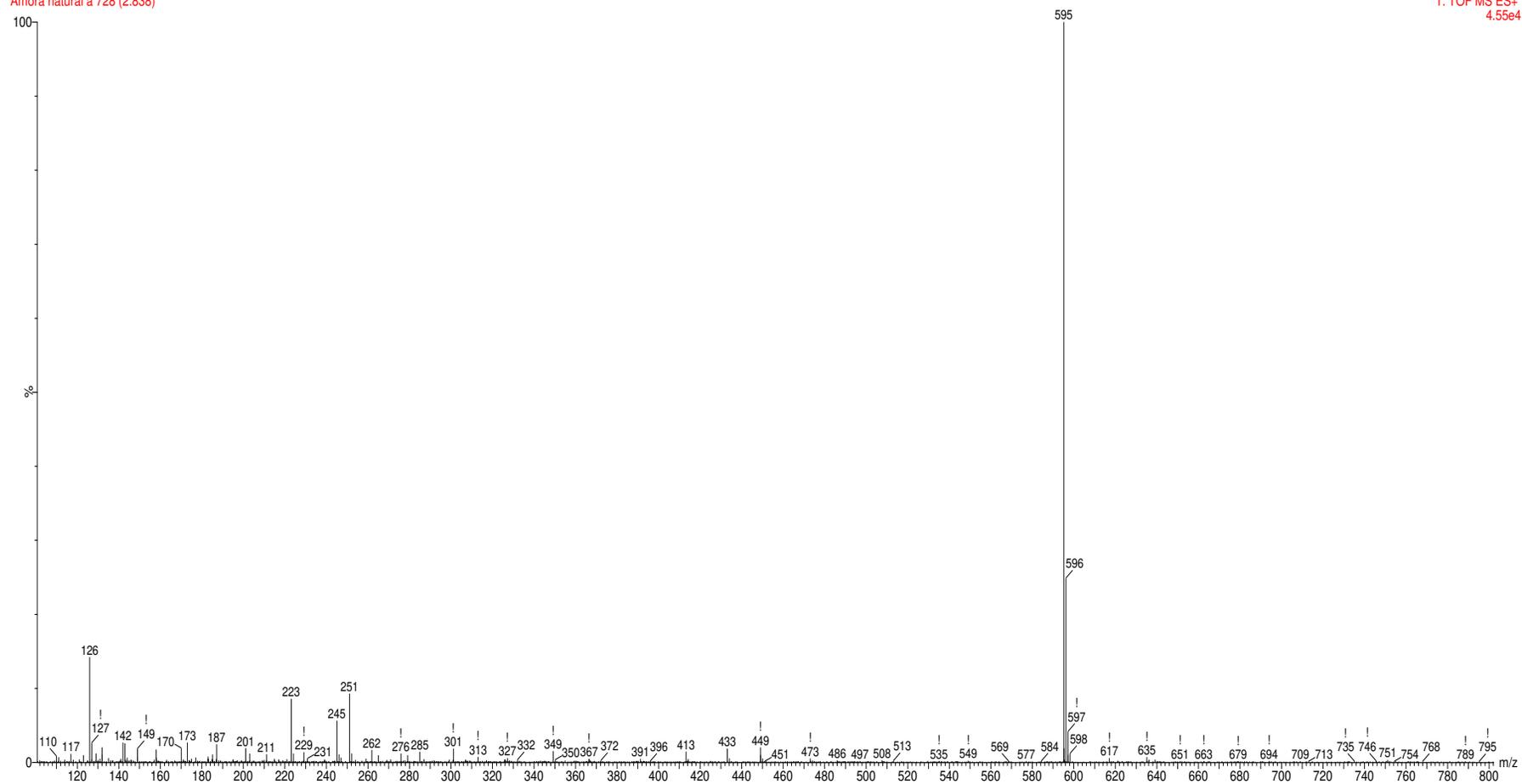
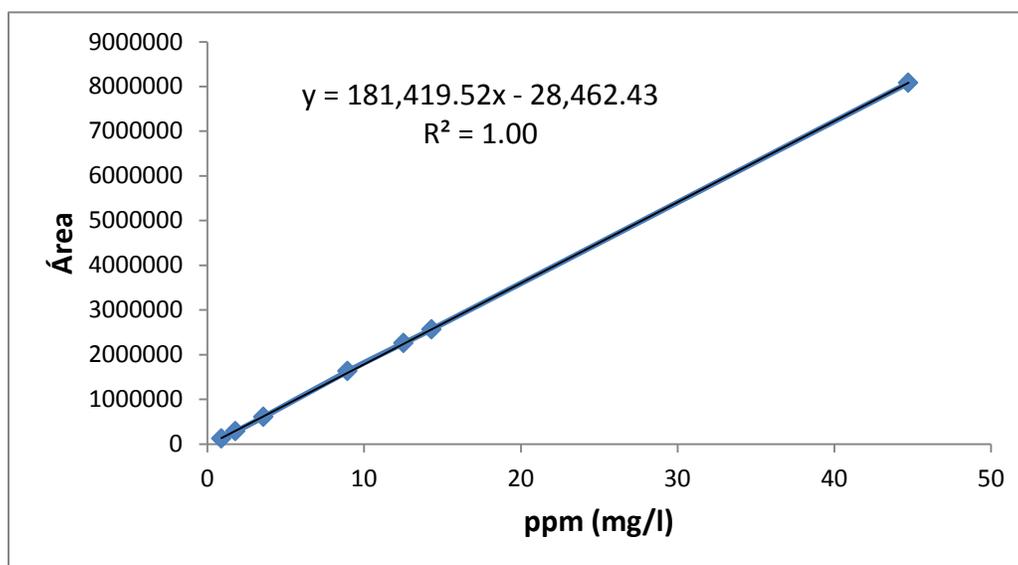
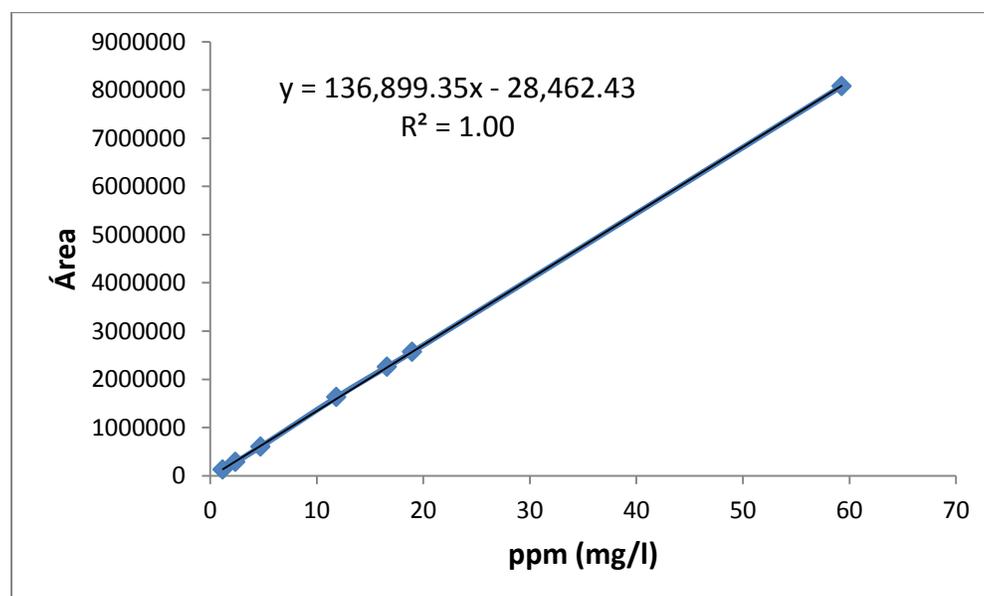
1: TOF MS ES+  
4.55e4

Figura A.9.7 – Cromatograma do íon da antocianina Cianidina-3-rutinosídeo (majoritária) de massa = 595 (m/z).

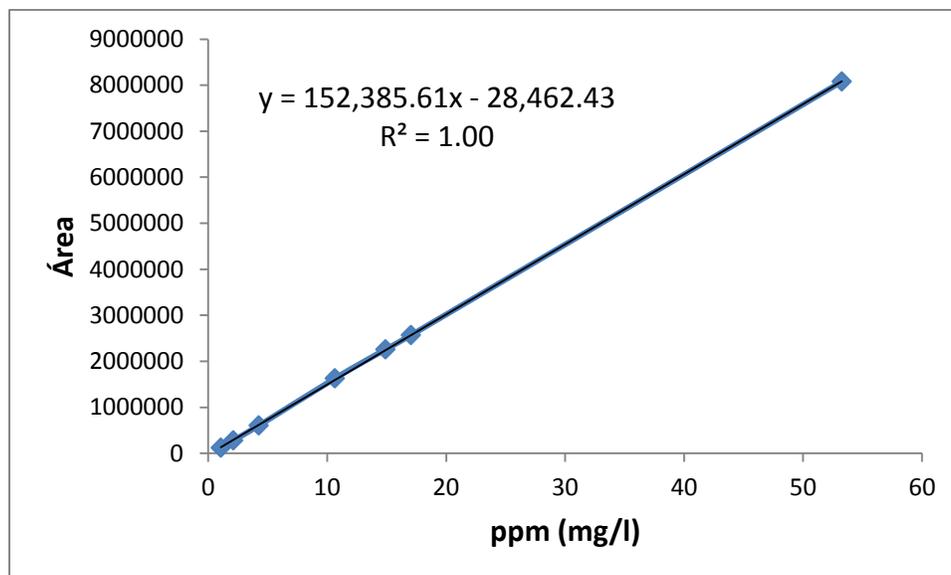
### 9.1.4 Curvas Padrão das Antocianinas



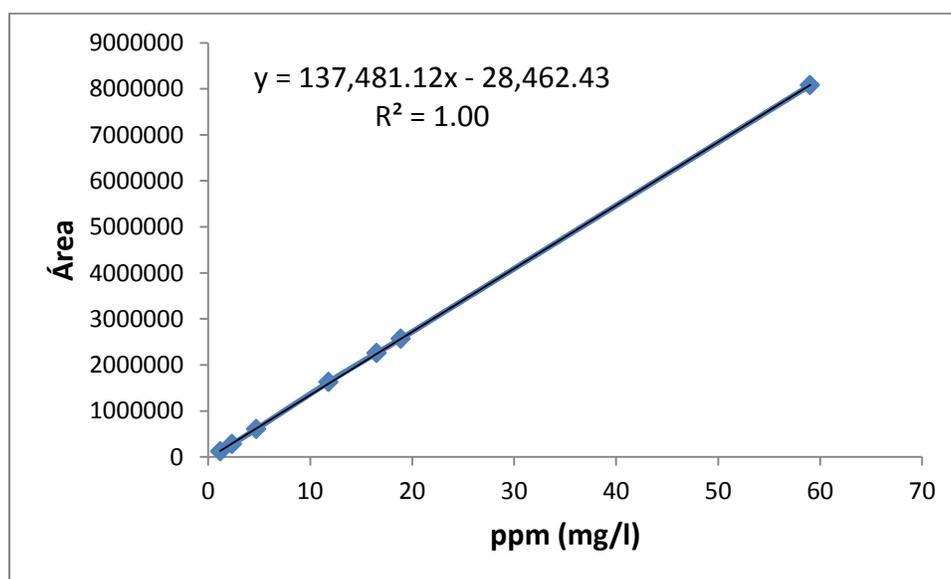
**Figura A.9. 8** – Curva padrão de cianidina-3-glicosídeo (C3G), área dos picos *versus* concentração de C3G (mg/L).



**Figura A.9. 9** – Curva padrão de cianidina-3-rutinosídeo (C3R), área dos picos *versus* concentração de C3R (mg/L).



**Figura A.9. 10** – Curva padrão de cianidina-3-malonil-glicosídeo (C3MG), área dos picos *versus* concentração de C3MG (mg/L).



**Figura A.9. 11** – Curva padrão de cianidina-3-dioxalil-glicosídeo (C3DG), área dos picos *versus* concentração de C3DG (mg/L).

### 9.1.5 Cinéticas de Extração

**Tabela A.9. 6** – Dados experimentais obtidos para a construção da curva global de extração na vazão de 1,67 mL/min.

<b>Tempo (minuto)</b>	<b>Extrato (g)</b>	<b>Extrato Acumulado (g)</b>	<b>Rendimento Global Acumulado (%)</b>
0	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.0798	0.0798	1.5432
4	0.0610	0.1408	2.7228
6	0.0303	0.1711	3.3088
8	0.0205	0.1916	3.7052
10	0.0161	0.2077	4.0166
15	0.0268	0.2345	4.5348
20	0.0245	0.2590	5.0086
25	0.0223	0.2813	5.4398
30	0.0207	0.3020	5.8402
40	0.0286	0.3306	6.3932
50	0.0249	0.3555	6.8747
60	0.0210	0.3765	7.2808
80	0.0293	0.4058	7.8475
100	0.0226	0.4284	8.2845
120	0.0205	0.4489	8.6809

**Tabela A.9. 7** – Dados experimentais obtidos para a construção da curva global de extração na vazão de 3,35 mL/min.

<b>Tempo (minuto)</b>	<b>Extrato (g)</b>	<b>Extrato Acumulado (g)</b>	<b>Rendimento Global Acumulado (%)</b>
0	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.0453	0.0453	0.8878
4	0.0377	0.0830	1.6267
6	0.0269	0.1099	2.1539
8	0.0221	0.1320	2.5871
10	0.0185	0.1505	2.9497
15	0.0397	0.1902	3.7277
20	0.0304	0.2206	4.3235
25	0.0216	0.2422	4.7469
30	0.0175	0.2597	5.0899
40	0.0274	0.2871	5.6269
50	0.0215	0.3086	6.0483
60	0.0153	0.3239	6.3481
80	0.0241	0.3480	6.8205
100	0.0165	0.3645	7.1438
120	0.0140	0.3785	7.4182

**Tabela A.9. 8** – Dados experimentais obtidos para a construção da curva global de extração na vazão de 6,70 mL/min.

<b>Tempo (minuto)</b>	<b>Extrato (g)</b>	<b>Extrato Acumulado (g)</b>	<b>Rendimento Global Acumulado (%)</b>
0	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.0422	0.0422	0.8281
4	0.0161	0.0583	1.1440
6	0.0153	0.0736	1.4442
8	0.0142	0.0878	1.7229
10	0.0095	0.0973	1.9093
15	0.0332	0.1305	2.5608
20	0.0226	0.1531	3.0043
25	0.0098	0.1629	3.1966
30	0.0093	0.1722	3.3791
40	0.0248	0.1970	3.8657
50	0.0196	0.2166	4.2503
60	0.0183	0.2349	4.6094
80	0.0269	0.2618	5.1373
100	0.0211	0.2829	5.5513
120	0.0188	0.3017	5.9202