



ÁDRIA DE SOUSA BENTES

**"COMPOSTOS BIOATIVOS DE JENIPAPO, LARANJA E MANGA:
COMPOSIÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO"**

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ÁDRIA DE SOUSA BENTES

**"COMPOSTOS BIOATIVOS DE JENIAPAO, LARANJA E MANGA:
COMPOSIÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO"**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Orientador(a): Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Ádria de Sousa Bentes e orientada pela Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante

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

B444c Bentes, Ádria de Sousa, 1986-
Compostos bioativos de jenipapo, laranja e manga : composição e desenvolvimento de métodos de extração / Ádria de Sousa Bentes. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Adriana Zerlotti Mercadante.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Compostos bioativos. 2. Micro-ondas. 3. Compostos fenólicos. 4. Iridoides. 5. Carotenoides. I. Mercadante, Adriana Zerlotti. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Bioactive compounds of genipap, orange and mango : composition and development of extraction methods

Palavras-chave em inglês:

Bioactive compounds

Microwave

Phenolic compounds

Iridoids

Carotenoids

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Adriana Zerlotti Mercadante [Orientador]

Fabio Yamashita

Lilian Regina de Barros Mariutti

Neura Bragagnolo

Severino Matias de Alencar

Data de defesa: 02-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
Orientadora

Prof. Dr. Fabio Yamashita
Membro Titular
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Dra. Lilian Regina de Barros Mariutti
Membro Titular
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Profa. Dra. Neura Bragagnolo
Membro Titular
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
Membro Titular
Universidade de São Paulo (ESALQ/USP)

Dr. Antonio Marsaioli Junior
Membro Suplente
Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues
Membro Suplente
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Wagner Vilegas
Membro Suplente
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

*Dedico este trabalho ao meu noivo Hugo,
meu maior incentivador e à minha família
pelo apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder saúde e perseverança para buscar meus sonhos

Ao meu noivo Hugo pelo companheirismo e constante incentivo, pelo apoio às minhas decisões e amparo nas dificuldades.

À minha família por me apoiar incondicionalmente em todas as escolhas da minha vida e me proporcionar a oportunidade de acesso a educação de qualidade. Em especial à minha mãe Rosângela por todo amor, carinho e incentivo a buscar meus sonhos.

À Universidade Estadual de Campinas pela infraestrutura disponível que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante pelo tempo dedicado a minha orientação e pelos ensinamentos ao longo do doutorado.

Ao Prof. Dr. Fabio Yamashita pela oportunidade de trabalho em conjunto e por todas as contribuições ao trabalho.

Às técnicas de laboratório Regiane Palhares, Rosemar Sant'Anna e Lilian Mariutti pelo auxílio e prestatividade constante, sem os quais a realização deste trabalho seria dificultada grandemente.

Aos membros da banca, titulares e suplentes pelas correções e sugestões e contribuíram muito para a melhora da tese.

À Capes pela bolsa de doutorado e à Fapesp pelo apoio financeiro.

Aos colegas e amigos que fizeram ou fazem do Laboratório de Química de Alimentos: Adones Sales, Aline Medina, Ana Augusta Xavier, Blanca Barriuso, Bruno Chacon, Daniele Rodrigues, Débora Venâncio, Elisângela Madalozzo, Eliseu Rodrigues, Fabiane Petry, Fernanda Mandelli, Gilsandro Costa, Kleidson Lobato, Marcella Marques, Naira Poerner, Poliana Gurak, Renan Chisté, Sarah Gurgel pelas experiências compartilhadas e pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos do GEEU (Grupo de Escalada Esportiva da UNICAMP) por me proporcionarem momentos de grande alegria e descontração.

À Karina Okamoto pela amizade de longa data, pelo carinho e incentivo.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho pudesse ser concretizado.

"Aprender é mudar posturas"

Platão

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	xvii
SUMMARY	xix
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	5

CAPÍTULO I

Revisão bibliográfica

1. Compostos fenólicos	9
2. Iridoides	13
3. Carotenoides	16
4. Jenipapo	19
5. Laranja	21
6. Manga	23
7. Extração assistida por micro-ondas	25
7.1. Compostos fenólicos	28
7.2. Carotenoides	29
Referências Bibliográficas	30

CAPÍTULO II

Influência do estágio de maturação na composição de iridoides e de compostos fenólicos de jenipapo (*Genipa americana* L.)

RESUMO	43
1. Introdução	45
2. Materiais e métodos	46

2.1. Padrões e reagentes.....	46
2.2. Materiais	47
2.3. Diferenciação entre frutos verdes e maduros	47
2.4. Análise da composição proximal	48
2.5. Determinação da composição de iridoides	49
2.6. Análise estatística dos resultados.....	51
3. Resultados e discussão.....	52
3.1. Diferenças entre frutos verdes e maduros	52
3.2. Composição proximal	53
3.3. Composição de iridoides.....	55
Agradecimentos	67
Referências	67

CAPÍTULO III

Otimização e validação de um novo método de extração assistida por micro-ondas de compostos fenólicos de laranja

RESUMO.....	75
1. Introdução	76
2. Materiais e métodos	77
2.1. Padrões e reagentes.....	77
2.2. Materiais	78
2.3. Extração sólido-líquido por agitação (SLE) de compostos fenólicos	79
2.4. Otimização da extração sólido-líquido assistida por micro-ondas (MAE) de compostos fenólicos	79
2.4.1. Planejamento experimental.....	79

2.4.2. Extração assistida por micro-ondas de compostos fenólicos	80
2.5. Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	81
2.6. Determinação da composição de compostos fenólicos	81
2.7. Validação do método de extração assistida por micro-ondas	82
2.8. Análise estatística dos resultados.....	83
3. Resultados e discussão.....	84
3.1. Extração SLE	84
3.2. Planejamento experimental	84
3.3. Otimização sequencial.....	86
3.4. Perfil de compostos fenólicos	89
3.5. Validação do método	93
4. Conclusão	96
Agradecimentos	96
Referências	96

CAPÍTULO IV

Desenvolvimento e validação de um método rápido para extração de carotenoides de manga

RESUMO.....	103
1. Introdução	105
2. Materiais e métodos	106
2.1. Padrões e reagentes.....	106
2.2. Materiais	107
2.3. Extração.....	108
2.3.1. Extração sólido-líquido por maceração.....	108

2.3.2. Extração sólido-líquido assistida por micro-ondas	109
2.3.3. Extração sólido-líquido por agitação magnética.....	110
2.4. Análise de carotenoides por HPLC-DAD-MS ²	111
2.5. Validação do método	112
2.6. Análise estatística dos resultados.....	113
3. Resultados e discussão.....	114
3.1. Composição de carotenoides	114
3.2. Escolha do solvente de extração	117
3.3. Avaliação da extração de carotenoides assistida por micro-ondas	119
3.4. Extração por agitação magnética.....	121
3.4. Validação do método	123
4. Conclusão	123
Agradecimentos	124
Referências	124
CONCLUSÃO GERAL	129

RESUMO GERAL

A ingestão de alimentos ricos em compostos bioativos, tais como iridoides, compostos fenólicos e carotenoides, está relacionada à redução do risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas. Para identificar as melhores fontes destes compostos é necessário o desenvolvimento de métodos adequados de extração que preservem a composição original da amostra. Os perfis de iridoides e de ácidos clorogênicos do endocarpo e do mesocarpo de jenipapo (*Genipa americana* L.) foram determinados nos estádios de maturação verde e maduro. Foram identificados ao todo, 17 compostos por HPLC-DAD-MSⁿ (14 iridoides e 3 compostos fenólicos). O geniposídeo foi o composto majoritário encontrado no jenipapo verde, tanto no endocarpo quanto no mesocarpo. No jenipapo maduro, a genipina-gentiobiosídeo foi o composto majoritário encontrado no endocarpo. O teor de iridoides encontrado no jenipapo maduro reduziu mais de 90% em relação ao jenipapo verde. Esta grande redução nos teores de geniposídeo que ocorre com a maturação, pode explicar a não formação de pigmento azul no jenipapo maduro. Não foram detectados compostos fenólicos no jenipapo maduro.

Uma nova metodologia de extração assistida por micro-ondas (MAE) para compostos fenólicos foi desenvolvida utilizando laranja cv. Pera [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], com diferentes teores de umidade: congelada e seca. O método MAE otimizado consistiu nos seguintes parâmetros: massa de 2,0 g para amostra congelada e de 0,2 g para amostra liofilizada, razão metanol:água de 8:2, volume de solvente de 25 mL, rampa de 30 s para atingir a temperatura de 50 °C, mantida por 10 min, utilizando como potência máxima 400 W e agitação de 200 rpm,

seguido por um período de resfriamento de 10 minutos. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os teores de compostos fenólicos totais obtidos para ambas as amostras pelo novo método. Além disso, a MAE não provocou alterações no perfil de compostos fenólicos da amostra. O método de MAE desenvolvido apresentou ótima repetibilidade ($RSD < 5\%$) e boa recuperação ($> 92\%$); foi 2,5 vezes mais rápido, consumiu 75 % menos solvente e utilizou metade da massa de amostra em relação à SLE, além de permitir a extração de várias amostras simultaneamente.

Uma nova metodologia para extração de carotenoides foi desenvolvida. Para isso, três formas de extração foram avaliadas: MAE, agitação magnética e extração tradicional por maceração, utilizando manga cv. Haden (*Mangifera indica* L.) liofilizada como matriz. Além disso, também foi avaliada a eficiência de extração dos solventes acetona e da mistura acetato de etila:metanol (1:1 v/v). Os teores de carotenoides totais obtidos com acetato de etila:metanol foram superiores ($P < 0,05$) aos obtidos com acetona em todos os métodos avaliados. A comparação dos resultados obtidos pelos diferentes métodos mostrou que as micro-ondas não exerceram influência na extração, e também não provocaram alterações no perfil de carotenoides da amostra. Assim, o método utilizando apenas agitação magnética foi escolhido para ser validado utilizando os seguintes parâmetros: 0,2 g de amostra, 20 mL de acetato de etila:metanol, 200 rpm por 5 min a temperatura ambiente. O novo método apresentou elevada precisão ($RSD < 3\%$) e exatidão (recuperação entre 101 % e 109 %). Além disso, o método foi cerca de 20 vezes mais rápido, consumiu 80 % menos amostra e 67 % menos solvente, quando comparado à extração por maceração.

SUMMARY

The intake of foods rich in bioactive compounds, such as iridoids, phenolic compounds and carotenoids, is related to the decreased risk of chronic degenerative diseases. To identify the best sources of these compounds is necessary to develop efficient quantitative extraction methods which are able to preserve the original composition of the sample. The composition of iridoids and chlorogenic acids from endocarp and mesocarp of unripe and ripe genipap (*Genipa americana* L.) were determined by HPLC-DAD-MSⁿ and a total of 17 compounds were identified (14 iridoids and 3 phenolic compounds). Geniposide was the major compound in both the endocarp and the mesocarp of unripe genipap, while genipin-gentiobioside was the major one in the endocarp of ripe genipap. A reduction above 90 % of the iridoid content was observed in ripe genipap in comparison with the unripe fruit. The large reduction in the levels of geniposide that occurred during ripening could explain the lack of formation of blue pigment in the ripe genipap. No phenolic compounds were detected in ripe genipap.

A new microwave-assisted extraction (MAE) method for the extraction of phenolic compounds was developed and validated using orange cv. Pera [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] in physical states with different moisture contents: frozen and dried. The optimized MAE method consisted of the following parameters: 2.0 g of frozen sample or 0.2 g of lyophilized sample; methanol:water ratio of 8:2; solvent volume of 25 mL; microwave program: 30 s ramp to reach 50 °C, this temperature was maintained for 10 min using the maximal power of 400 W; and 200 rpm of agitation, followed by a cooling period of 10 min. No differences were found ($P > 0.05$) between the total phenolic contents of both lyophilized and fresh samples

using the new MAE method. In addition, MAE did not cause any alterations in the phenolic compound profile. The MAE method developed showed excellent repeatability (RSD < 5%) and good recovery (> 92 %). It was 2.5 faster than SLE; consumed 75 % less solvent and used half the mass of sample when compared with SLE. In addition, MAE allows the simultaneous extraction of several samples.

A new methodology for the extraction of carotenoids was developed. For this purpose, three methods of extraction were evaluated using lyophilized mango cv. Haden (*Mangifera indica* L.) as food matrix: MAE, magnetic stirring and conventional extraction by maceration. In addition, the extraction efficiency of the solvents acetone and a mixture of ethyl acetate:methanol (1:1 v/v) was also evaluated. The contents of total carotenoids obtained with ethyl acetate:methanol were higher ($P < 0.05$) than those obtained with acetone in all the methods evaluated. The comparison of the results obtained from the different methods showed that the microwaves did not influence the carotenoid extraction and did not significantly change the profile of carotenoids of the sample. Therefore, the method using only magnetic stirring was chosen to be validated using the following parameters: 0.2 g of sample, 20 mL of ethyl acetate:methanol, 200 rpm for 5 min at room temperature. The new method for carotenoid extraction showed high precision (RSD < 3%) and accuracy (recoveries between 101 % and 109%). Moreover, the new method was almost 20 times faster, consumed 80% less sample and 67% less solvent than to the conventional extraction by maceration.

INTRODUÇÃO GERAL

Os iridoides, os compostos fenólicos e os carotenoides são metabólitos secundários de plantas e são classificados como compostos bioativos em virtude de apresentarem diversos tipos de atividade biológica, como capacidade antioxidante e anti-inflamatória (Ahmad et al., 2008; Beara et al., 2012; Chiste et al., 2011).

Os iridoides são monoterpenos que apresentam como característica peculiar a capacidade de reagir com aminoácidos e proteínas e formar compostos coloridos (Francis, 2002). Dentre estes compostos destaca-se o geniposídeo, um iridoide glicosilado cuja aglicona, denominada genipina, é capaz de reagir com aminas primárias e formar um pigmento de coloração azul, conhecido como "pigmento azul" (Touyama et al., 1994). O geniposídeo e a genipina, estão presentes somente em gardênia (*Gardenia jasminoides*) e em jenipapo (*Genipa americana* L.). A gardênia é nativa da China, enquanto que o jenipapo é uma planta nativa da amazônia cujos frutos no estágio verde de maturação são utilizados pelos índios, desde tempos remotos, para extração de pigmento azul utilizado em pinturas corporais e de cerâmicas (Cavalcante, 1991; Djerassi, Gray, & Kincl, 1960; Ueda, Iwahashi, & Tokuda, 1991).

Os compostos fenólicos possuem como estrutura básica o anel fenólico e são classificados comumente em flavonoides e não flavonoides (Crozier, Jaganath, & Clifford, 2009). Os flavonoides constituem o grupo de compostos fenólicos mais importante em alimentos devido à sua ampla ocorrência, sendo ainda considerados os antioxidantes mais abundantes da dieta humana (Lee, 2004).

Os carotenoides constituem o grupo de pigmentos mais amplamente distribuído na natureza, sendo encontrados em plantas, algas, fungos, bactérias e animais (Delgado-Vargas, Jimenez, & Paredes-Lopez, 2000). Estes compostos apresentam um amplo sistema de ligações duplas conjugadas, cujos elétrons π se deslocam sobre toda a cadeia poliênica, de forma que a energia necessária para transições eletrônicas é baixa, e corresponde à região do visível na faixa de 400 a 500 nm, o que dá origem às cores amarela, laranja e vermelha, comumente associadas aos carotenoides (Britton, Liaaen-Jensen, & Pfander, 2008).

A determinação destes compostos em diversas matrizes alimentícias é de suma importância, para definição das melhores fontes. Para a determinação de qualquer composto, a extração é a primeira e uma das etapas mais importantes, pois deve-se preservar ao máximo a composição e a concentração dos compostos presentes na matriz analisada para que os resultados finais sejam os mais exatos possíveis (Azmir et al., 2013). Dentre as diversas técnicas de extração, destaca-se a utilização das micro-ondas, que começou a se difundir para este fim em meados da década de 1990, destacando-se como uma técnica de alto rendimento, que permite um rápido aquecimento da mistura amostra/solvente, utiliza menos solvente e requer menor tempo para extração (Eskilsson & Björklund, 2000).

Considerando o exposto acima, este trabalho visou avaliar a composição de iridoides de jenipapo em diferentes estádios de maturação a fim de determinar qual o mais adequado para obtenção de geniposídeo/genipina, que podem ser utilizados para obtenção de pigmento azul. Teve por objetivo ainda, desenvolver novas metodologias de extração assistidas por micro-ondas (MAE), uma para compostos fenólicos e outra para carotenoides, que podem auxiliar na rotina de análises laboratoriais, por serem mais rápidas, consumirem menos solventes e

consequentemente produzirem menos resíduos. O estudo da utilização da MAE para compostos bioativos também contribui para maior compreensão dos efeitos e limitações desta técnica sobre estes compostos, principalmente sobre os carotenoides.

Referências Bibliográficas

- Ahmad, I., Chen, S., Peng, Y., Chen, S., & Xu, L. (2008). Lipoxygenase inhibiting and antioxidant iridoids from *Buddleja crispa*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(1), 140-143.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Beara, I. N., Lesjak, M. M., Orcic, D. Z., Simin, N. D., Cetojevic-Simin, D. D., Bozin, B. N., & Mimica-Dukic, N. M. (2012). Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. *Lwt-Food Science and Technology*, 47(1), 64-70.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2008). Special molecules, special properties. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids volume 4: natural functions*. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Cavalcante, P. B. (1991). *Frutas comestíveis da Amazônia* (5ª ed.). Belém: CEJUP/Museu Paraense Emílio Goeldi.
- Chiste, R. C., Mercadante, A. Z., Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F. D., & Bragagnolo, N. (2011). In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 127(2), 419-426.

- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001-1043.
- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A. R., & Paredes-Lopez, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173-289.
- Djerassi, C., Gray, J. D., & Kincl, F. A. (1960). Naturally occurring oxygen heterocyclics. IX. Isolation and characterization of genipin. *Journal of Organic Chemistry*, 25(12), 2174-2177.
- Eskilsson, C. S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- Francis, F. J. (2002). Food colorings. In D. B. MacDougall (Ed.), *Colour in Food: Improving Quality* (pp. 297-330). Boca Raton: CRC Press.
- Lee, H. S. (2004). Phenolic compounds in foods. In L. M. L. Nollet (Ed.), *Handbook of food analysis* (2nd ed., Vol. 3, pp. 657-715). Boca Raton: CRC Press.
- Touyama, R., Takeda, Y., Inoue, K., Kawamura, I., Yatsuzuka, M., Ikumoto, T., Shingu, T., Yokoi, T., & Inouye, H. (1994). Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. I. Structures of the brownish-red pigments, intermediates leading to the blue pigments. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 42(3), 668-673.
- Ueda, S., Iwahashi, Y., & Tokuda, H. (1991). Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell-cultures. *Journal of Natural Products*, 54(6), 1677-1680.

OBJETIVOS

Considerando o exposto na introdução geral, este trabalho apresenta os seguintes objetivos:

- 1) Determinar as características físico-químicas do mesocarpo e do endocarpo de jenipapo (*Genipa americana* L.) nos estádios de maturação verde e maduro.
- 2) Determinar por HPLC-DAD-MS/MS a composição de iridoides em endocarpo e mesocarpo de jenipapo (*Genipa americana* L.) nos estádios de maturação verde e maduro.
- 3) Desenvolver, por meio de um planejamento experimental, e validar uma metodologia para extração de compostos fenólicos assistida por micro-ondas, utilizando como matriz laranja [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera] tanto congelada como liofilizada.
- 4) Desenvolver, por meio de um planejamento experimental, e validar uma metodologia para extração de carotenoides assistida por micro-ondas, utilizando como matriz manga (*Mangifera indica* L. cv. Haden) liofilizada.

CAPÍTULO I

Revisão bibliográfica

1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos que apresentam um ou mais grupos hidroxila ligados a um anel aromático. Os polifenóis apresentam mais de um grupo hidroxil-fenólico ligado a um ou mais anéis benzênicos (Vermerris & Nicholson, 2006). Esses compostos são metabólitos secundários de plantas e apresentam diversas funções, como pigmentação; antibióticos; pesticida; atrativo para polinizadores; proteção contra a radiação ultravioleta; isolante, tornando a parede celular impermeável a gás e a água; e estrutural, dando estabilidade às plantas (Andrés-Lacueva et al., 2010; Shahidi & Naczki, 2011).

A classificação dos compostos fenólicos pode ser realizada de acordo com o número de anéis fenólicos e elementos estruturais ligados a estes anéis. Comumente adota-se a divisão em dois grupos principais: os flavonoides e os não flavonoides. Os flavonoides apresentam uma estrutura básica constituída pelo núcleo flavan, que consiste em 15 átomos de carbono distribuídos em 3 anéis (C6-C3-C6), que são denominados A, B e C (Figura 1).

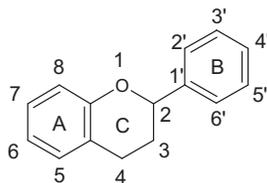


Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides.

Dentro do grupo dos flavonoides estão incluídos os seguintes subgrupos: flavanonas, flavonas, diidroflavonois, flavonois, flavan-3-ols, antocianidinas, isoflavonas, cumarinas, chalconas, diidrochalconas e auronas (Figura 2). Os não

flavonoides são classificados de acordo com o número de carbonos que eles possuem, sendo subdivididos em: fenóis simples, ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos, taninos hidrolisáveis, acetofenonas, benzofenonas, xantonas, estilbenos e lignanas (Andrés-Lacueva et al., 2010; Crozier, Jaganath, & Clifford, 2009).

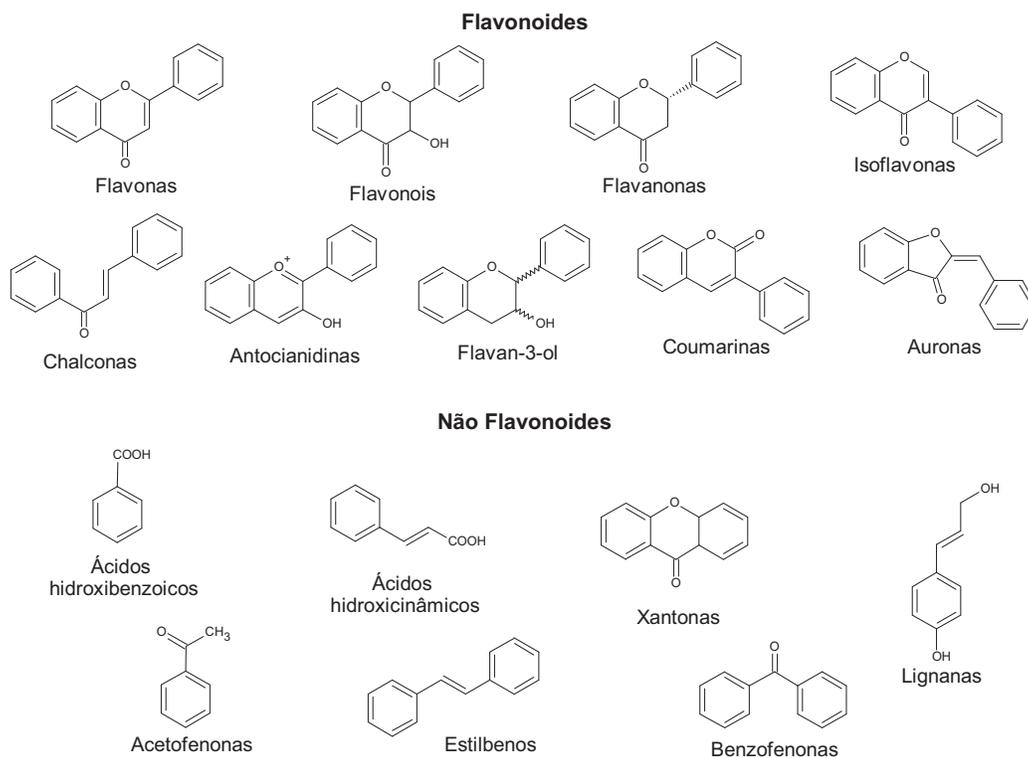


Figura 2. Estruturas dos subgrupos dos flavonoides e dos não flavonoides.

Os flavonoides constituem o grupo de compostos fenólicos mais importante em alimentos devido à sua ampla ocorrência. Estes compostos são frequentemente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e/ou 5', e em muitos casos, os grupos hidroxilas estão metilados, acetilados, prenilados ou sulfatados. Os flavonoides são encontrados na forma aglicona ou glicosilada, ligados a açúcares

por um carbono (C-glicosídeos) ou por um grupo hidroxila (O-glicosídeos), sendo este último mais frequente que o primeiro. Nos O-glicosídeos o açúcar substituinte encontra-se mais comumente ligado a grupos hidroxila da aglicona nas posições 3 ou 7, enquanto que os C-glicosídeos apresentam açúcares ligados normalmente aos carbonos C-6 e C-8. Independentemente do tipo de ligação, os monossacarídeos mais comuns são: ramnose, glicose, galactose e arabinose. Também podem ocorrer ligações com dissacarídeos, sendo os dois mais frequentes formados por glicose e ramnose ligados em posições diferentes formando a rutinose (1→6) e a neohesperidose (1→2) (De Rijke et al., 2006; Lee, 2004; Shahidi & Naczk, 2003).

Os compostos fenólicos são sintetizados a partir da rota do chiquimato (Figura 3) a qual se inicia com a condensação do fosfoenolpiruvato com a eritrose 4-fosfato que através de uma série de reações resulta no shiquimato, o qual origina o corismato que é precursor dos aminoácidos aromáticos, triptofano, tirosina e fenilalanina. O triptofano é precursor dos alcaloides, a tirosina e a fenilalanina são precursoras dos compostos fenólicos, sendo a fenilalanina o precursor mais amplamente utilizado para síntese destes compostos (Herrmann, 1995; Singh, Rastogi, & Dwivedi, 2010). A biossíntese de flavonoides inicia com a condensação do *p*-coumaroil-CoA com 3 moléculas de malonil-CoA dando origem às chalconas que em seguida ciclizam sob condições ácidas (Shahidi & Naczk, 2003; Vermerris & Nicholson, 2006).

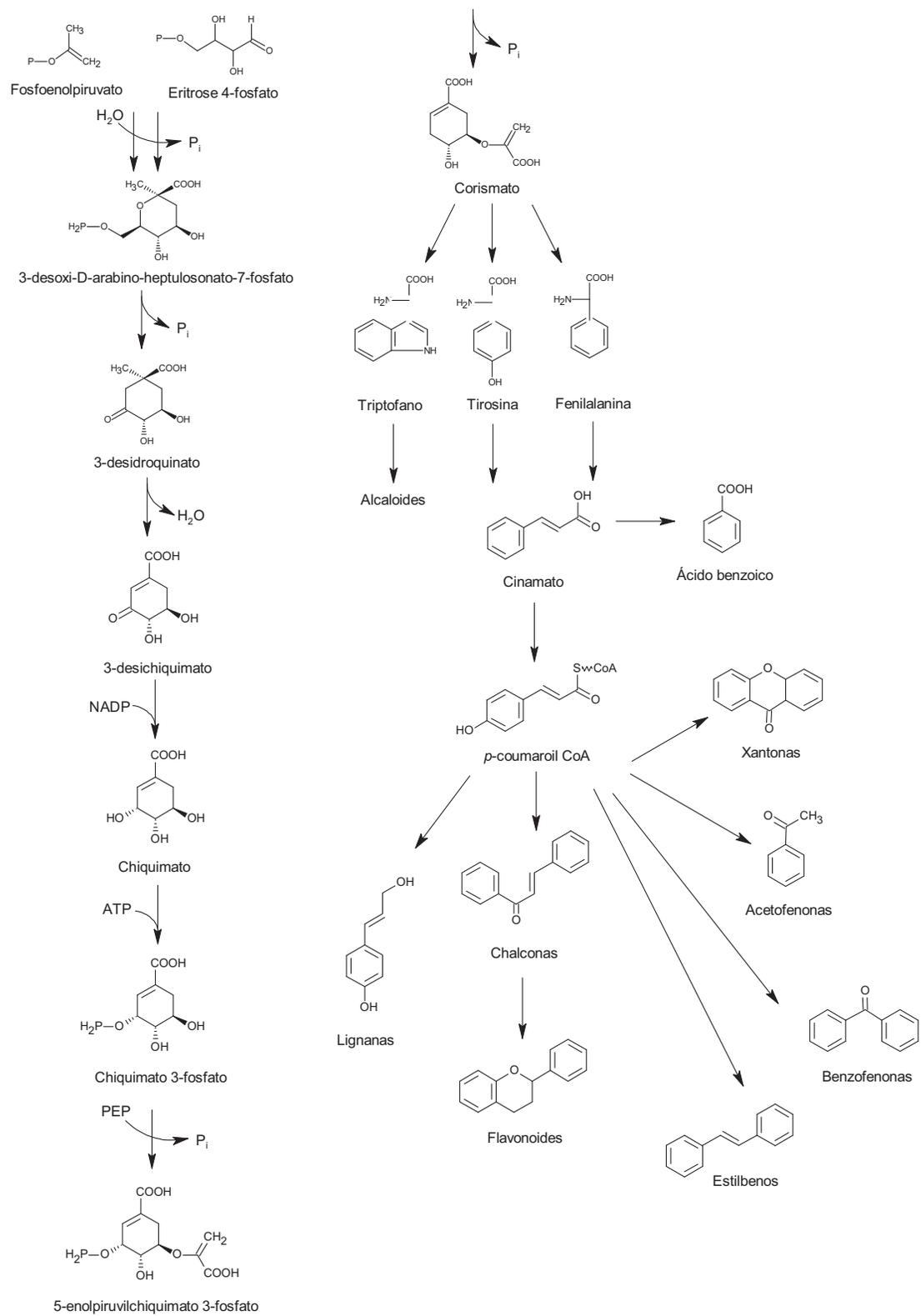


Figura 3. Biossíntese dos compostos fenólicos. Adaptado de Herrmann (1995); Shahidi & Naczk (2003); Vogt (2010).

2. Iridoides

Os iridoides constituem o maior grupo de monoterpenoides com esqueleto ciclopentano[c]pirano (Figura 4a). O termo iridoide é derivado dos compostos iridomirmecina, iridolactona e iridodial, os quais são compostos de defesa secretados por algumas espécies de formiga do gênero *Iridomyrmex* (Dinda, Debnath, & Harigaya, 2007a; Elnaggar & Beal, 1980). Entretanto, excetuando-se os poucos compostos que são encontrados em insetos e organismos marinhos, a maioria dos iridoides são resultantes do metabolismo secundário de plantas do grupo das angiospermas (Bianco, 1994; Taskova, Kokubun, & Alipieva, 2010).

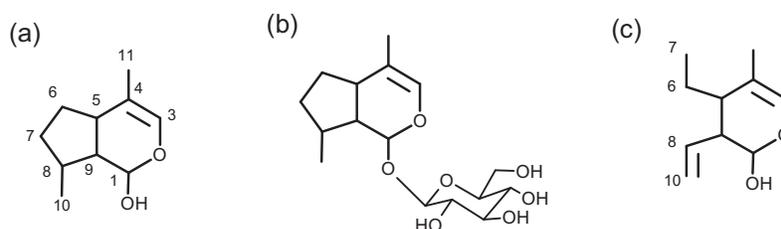


Figura 4. Estruturas de iridoides: (a) simples, (b) glicosilado, (c) secoiridoide.

Os iridoides são divididos em: simples ou não glicosilados, glicosilados, principalmente nas posições 1 e 5 (Figura 4b), secoiridoides, que são originados a partir da clivagem do anel ciclopentano entre os carbonos 7 e 8 (Figura 4c), e bisiridoides, os quais são resultantes da dimerização de iridoides e secoiridoides (Bianco, 1994; Villasenor, 2007).

Nas plantas, os iridoides são sintetizados a partir do geranil, o qual pode ser obtido por meio de duas vias biossintéticas, a do ácido mevalônico (MVA) e a do 2-metil-D-eritriol-4-fosfato (MEP) (Dewick, 1997; Faria et al., 2010). Após a hidroxilação do geranil, a síntese de iridoides pode seguir duas rotas distintas: a

rota I, que se dá a partir do iridodial, via iridotrial até o ácido deoxilogânico, que é precursor de diversos iridoides carboxilados; e a *rota II*, que ocorre a partir do 8-*epi*-iridodial, via 8-*epi*-iridotrial, até o 8-*epi*-ácido desoxilogânico, o qual é precursor de iridoides descarboxilados (Dewick, 1997; Jensen et al., 2010), conforme apresentado na Figura 5.

Outras variações na estrutura básica já foram relatadas, como clivagem do anel pirano, oxidação do esqueleto básico a aldeído ou ácido, epoxidação do anel ciclopentano, introdução de insaturação e de grupos acetoxi e carboxila (Dinda, Debnath, & Harigaya, 2007a; Taskova, Kokubun, & Alipieva, 2010; Villasenor, 2007). Os iridoides podem ainda estar esterificados com ácidos, sendo os mais comuns, os derivados dos ácidos benzoico e cinâmico; e estas esterificações ocorrem principalmente nas posições 6, 8 e 10 (AlHazimi & Alkathlan, 1996; Dinda, Debnath, & Harigaya, 2007a).

Mais de 800 estruturas distintas de iridoides já foram relatadas na literatura (Dinda, Chowdhury, & Mohanta, 2009; Dinda, Debnath, & Banik, 2011; Dinda, Debnath, & Harigaya, 2007a, b). Iridoides podem ser utilizados como marcadores quimiotaxonômicos de classificação vegetal (Sampaio-Santos & Kaplan, 2001).

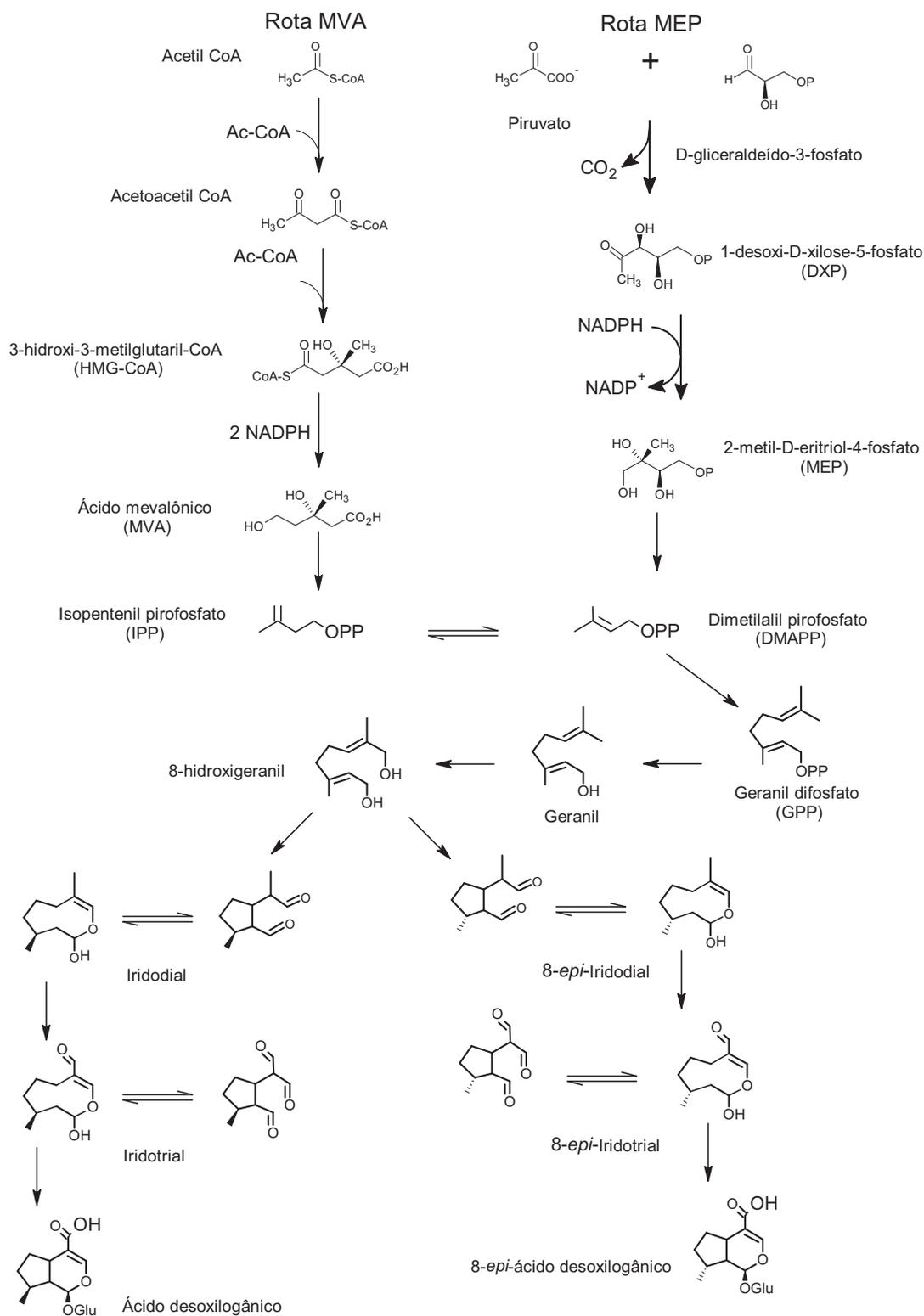


Figura 5. Biossíntese de iridoides. Adaptado de Dewick (1997); Faria et al. (2010); Sampaio-Santos & Kaplan (2001).

3. Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis amplamente distribuídos no reino vegetal, mas que também ocorrem em micro-organismos e animais. Plantas e micro-organismos são capazes de sintetizar carotenoides, enquanto que a presença destes compostos em animais é devido à dieta. A maioria dos carotenoides apresenta como estrutura básica um tetraterpeno com esqueleto de 40 átomos carbono, formado por 8 unidades de isopreno ligadas de forma que a simetria é invertida no centro (Figura 6). Este extenso sistema de ligações duplas conjugadas (cadeia poliênica) forma o cromóforo da molécula, sendo que estes pigmentos podem apresentar cores variando do amarelo ao vermelho.

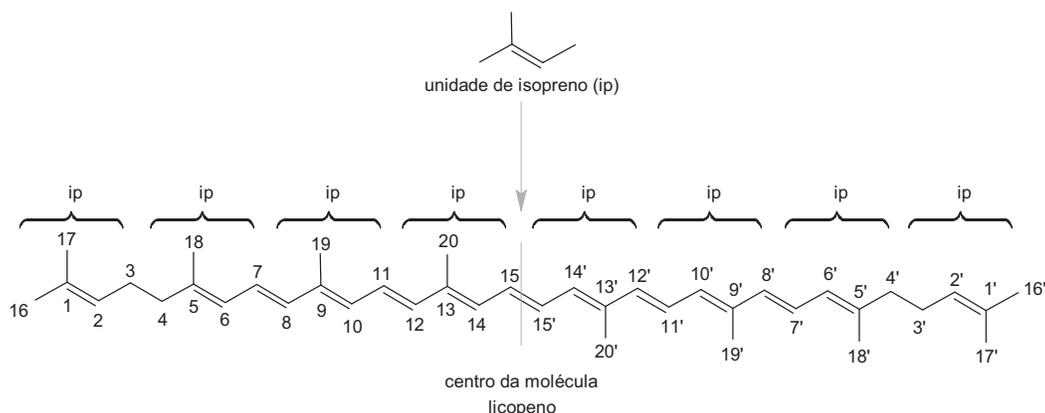


Figura 6. Estrutura básica dos carotenoides. Adaptado de Delgado-Vargas, Jimenez & Paredes-Lopez (2000).

Dentre as variações na estrutura básica pode ocorrer ciclização de uma ou das duas extremidades, mudança no nível de hidrogenação e adição de grupos funcionais contendo oxigênio (Britton, 1995). Desta forma, os carotenoides podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química em carotenos, cuja

estrutura é composta apenas por átomos de carbono e de hidrogênio; e xantofilas, que apresentam além de carbono e hidrogênio, também oxigênio (Delgado-Vargas, Jimenez, & Paredes-Lopez, 2000). Mais de 700 estruturas distintas de carotenoides já foram isoladas de fontes naturais (Britton, Liaaen-Jensen, & Pfander, 2004).

Além das variações estruturais citadas, pode ocorrer ainda isomeria geométrica, o que teoricamente, permitiria a existência não somente dos isômeros "all-trans", como diversas possibilidades de "mono-cis" e "poli-cis". Entretanto, apenas alguns isômeros *cis* são encontrados na natureza, pois a presença de uma ligação *cis* cria impedimento estérico entre átomos de hidrogênio e/ou grupos metila próximos, tornando este tipo de isômero termodinamicamente menos favorável que a forma "all-trans". Os carbonos nas posições 9, 13 e 15 possuem impedimento estérico pequeno, facilitando a formação e relativa estabilidade destes isômeros. As posições 7 e 11 são mais difíceis de isomerizar e raramente são encontradas na natureza (Britton, 1995).

Assim como os iridoides, os carotenoides são biossintetizados a partir do geranyl, que nos organismos fotossintéticos é obtido a partir do MEP (Figura 7). Organismos do reino Archaea, algumas bactérias e fungos utilizam a via do MVA (Walter & Strack, 2011).

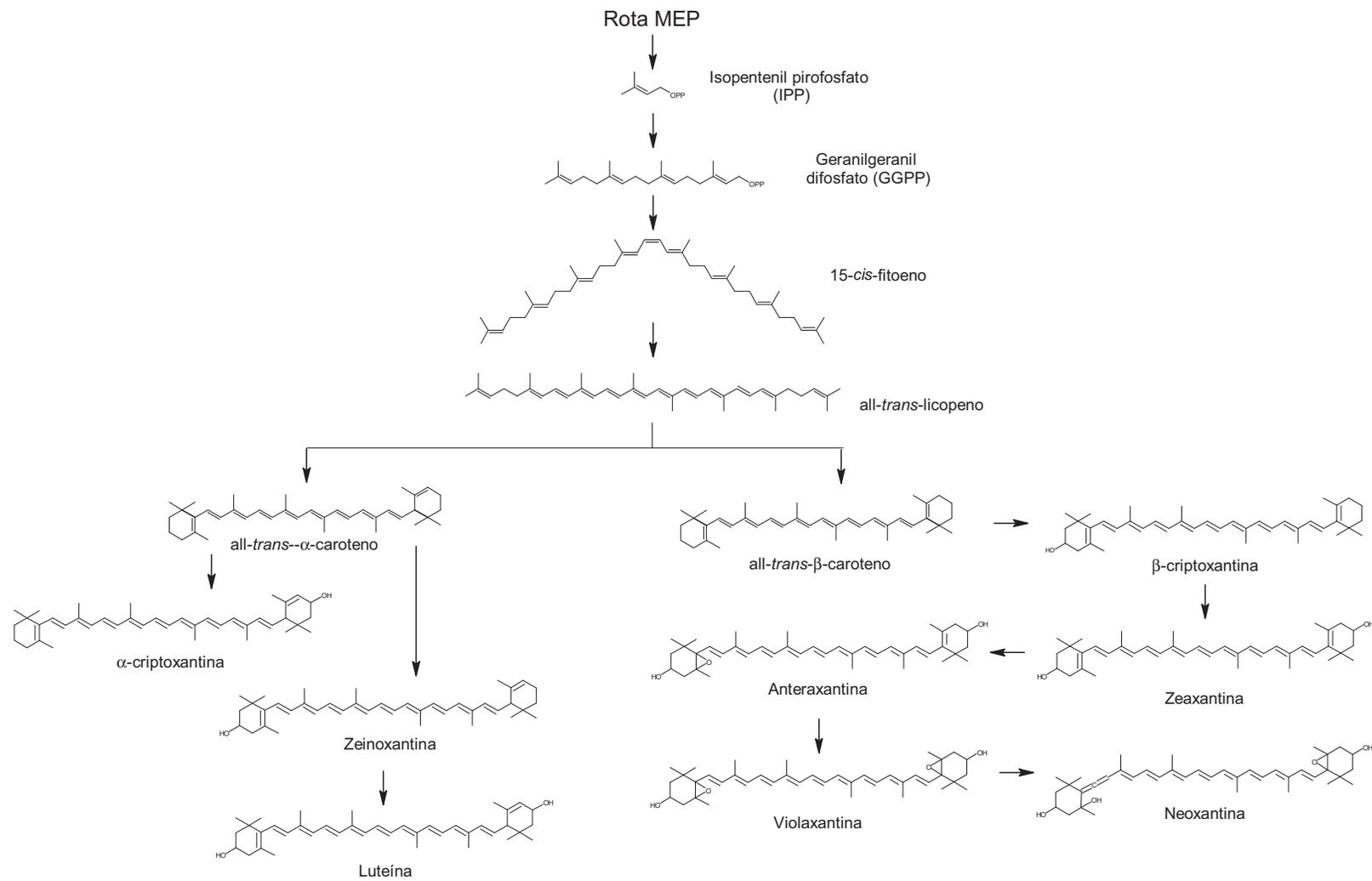


Figura 7. Biossíntese de carotenoides. Adaptado de DellaPenna (1999); Farré et al. (2010).

A condensação de duas moléculas de geranyl-geranyl difosfato, origina o primeiro carotenoide com 40 carbonos, o 15-*cis*-fitoeno, que após 4 dessaturações é convertido a licopeno, o qual é ciclizado nas extremidades, podendo formar 2 anéis β -ionona, originando o β -caroteno, ou ainda, formar um anel β -ionona e um ϵ -ionona, resultando no α -caroteno (DellaPenna, 1999). As xantofilas são produtos da oxidação do α - e do β -caroteno, que podem levar a formação de hidroxila no carbono 3 dos anéis β - e ϵ -ionona; epóxido na posição 5,6 do anel β -ionona, ou ainda, cetona na posição 4 (Sandmann, 2001).

4. Jenipapo

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma planta pertencente à família Rubiaceae, originária da Amazônia, que se desenvolve principalmente em áreas de várzea, mas também se distribui amplamente por áreas tropicais e subtropicais da América Latina (UNCTAD, 2005).

As árvores são de médio porte e podem apresentar de 6 a 8 m de altura por 4 a 6 m de diâmetro de copa, com flores brancas ou amareladas. Os frutos do jenipapeiro (Figura 8) são do tipo baga subglobosa, e quando maduros, medem de 6 a 10 cm de diâmetro longitudinal por 4 a 7 cm de diâmetro transversal, e pesam entre 90 e 180 g. A cavidade central contém de 220 a 372 sementes envolvidas por uma membrana. O período de floração ocorre de outubro a janeiro e a frutificação de novembro a fevereiro, na qual cada planta é capaz de produzir de 200 a 1000 frutos (Carvalho, Nascimento, & Müller, 1998; Silva et al., 2001).

No Brasil, o jenipapo maduro é utilizado para fabricação de doces, geléias, licores e vinhos (Silva et al., 2001). O fruto verde é utilizado pelos índios para tingir o corpo, tecidos e objetos diversos (Cavalcante, 1991). O nome jenipapo originou-

se desta qualidade tintorial, derivado do tupi-guarani “nhandipab” ou “jandipab”, que significa “fruto que serve para pintar” (Silva & Tassara, 2005). Apesar da facilidade de coleta e das diversas possibilidades de utilização não há dados sobre a produção comercial deste fruto no Brasil.



Figura 8. Jenipapo (*Genipa americana* L.) nos estádios de maturação verde (esquerda) e maduro (direita).

Vários iridoides já foram identificados por ressonância magnética nuclear (RMN) no jenipapo (Figura 9), entretanto, não há dados sobre o teor de iridoides nesse fruto. Por outro lado, trabalhos com frutos de *Gardenia jasminoides*, planta que pertence à mesma família do jenipapo (Rubiaceae), relatam que o teor de geniposídeo, principal iridoide deste fruto, pode variar de 73 a 109 mg/g de matéria seca (Tsai et al, 2002; Yang, Liu, & Gao, 2009).

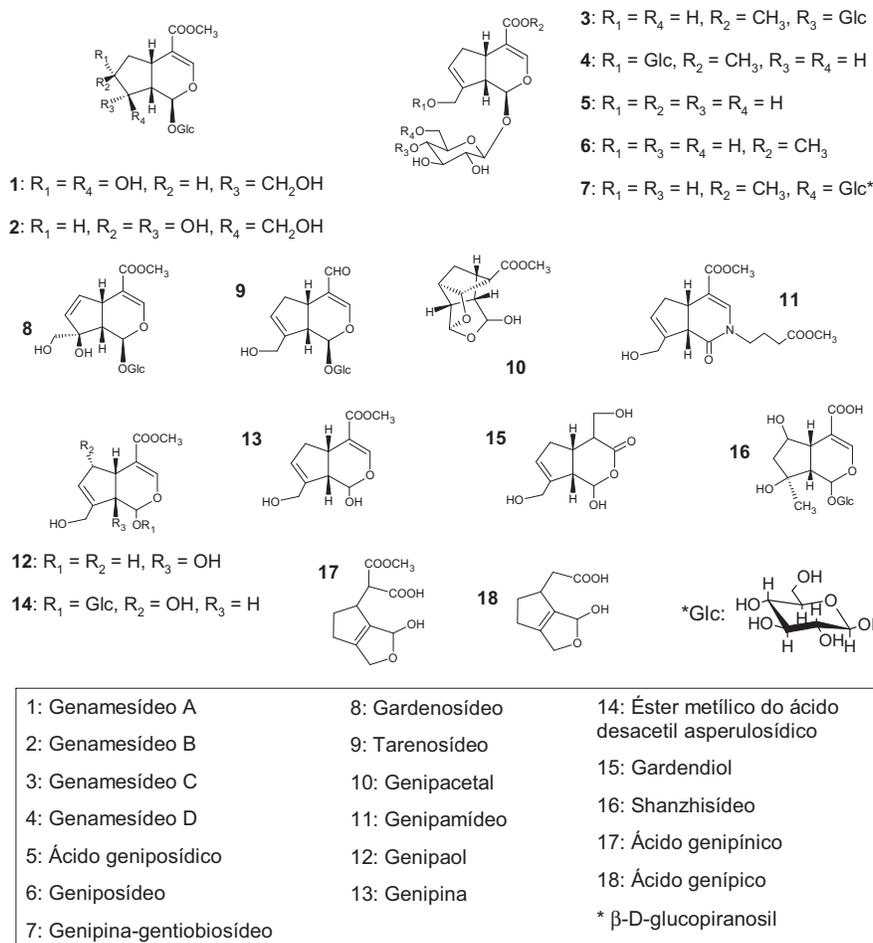


Figura 9. Iridoides identificados em jenipapo (*Genipa americana* L.) [1-4 e 7 (Ono et al., 2005); 5 (Guarnaccia et al., 1972); 6, 8-9 (Ueda, Iwahashi, & Tokuda, 1991); 10-12, 14-16 (Ono et al., 2007); 13 (Djerassi, Gray & Kincl, 1960); 17-18 (Tallent, 1964)].

5. Laranja

As espécies cítricas são originárias de áreas tropicais e subtropicais da Ásia e foram introduzidas no Brasil pelos portugueses no século XVI. A laranja Pera [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera] (Figura 10) é uma cultivar cuja planta apresenta porte médio, copa ereta, com flores de coloração verde clara. Os frutos são oblongos e apresentam maturação tardia (julho a setembro) com produções

temporãs ao longo do ano (Almeida & Passos, 2011; Donadio, Figueiredo, & Pio, 1995). As laranjas da espécie *Citrus sinensis* são classificadas como "laranjas doces", categoria que pode ser dividida em 4 subclasses: comum, navel, valencia e sanguínea. A cultivar Pera pertence à subclasse comum (Peterson et al., 2006).

A produção mundial de laranja no ano de 2011 foi de 69,61 milhões de toneladas. O Brasil é o maior produtor, com 28,46% do total, sendo o estado de São Paulo responsável por 75% da produção nacional. Do total produzido pelo Brasil, 76% é destinado à indústria de suco de laranja (FDOC, 2013; IBGE, 2013). A cadeia produtiva do suco de laranja no Brasil é responsável pela geração de mais de 200 mil empregos diretos e indiretos e pela arrecadação de US\$189 milhões em impostos para o país (Neves et al., 2010).



Figura 10. Laranja Pera [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera].

A laranja é uma fonte significativa de flavonoides, principalmente flavanonas que são encontradas no fruto como um todo (flavedo, albedo, segmentos e membranas), sendo a maior concentração encontrada na casca (flavedo + albedo). As flavanonas são compostos característicos dos cítricos devido a alta concentração em que são encontrados nestes frutos. Estes compostos ocorrem

mais frequentemente na forma glicosídica, como rutinosídeos (6-O- α -L-ramnosil-D-glicosídeo) e neohesperidosídeos (2-O- α -L-ramnosil-D-glicosídeo) ligados na posição 7 (Tomás-Barberán, & Clifford, 2000).

As principais flavanonas das laranjas doces são a hesperidina (hesperitina-7-O-rutinosídeo) e a narirutina (narigenina-7-O-rutinosídeo) (Figura 11) (Peterson et al., 2006). A concentração média de hesperidina em laranja Pera pode variar bastante dependendo de diversos fatores como, grau de maturação, clima, solo, etc. Pupin, Dennis e Toledo (1998) encontraram em suco de laranja cv. Pera espremido manualmente uma concentração de hesperidina de 255,8 mg/L de suco, enquanto que Dhuique-Mayer et al. (2005) encontraram um teor de 502 mg/L de suco.

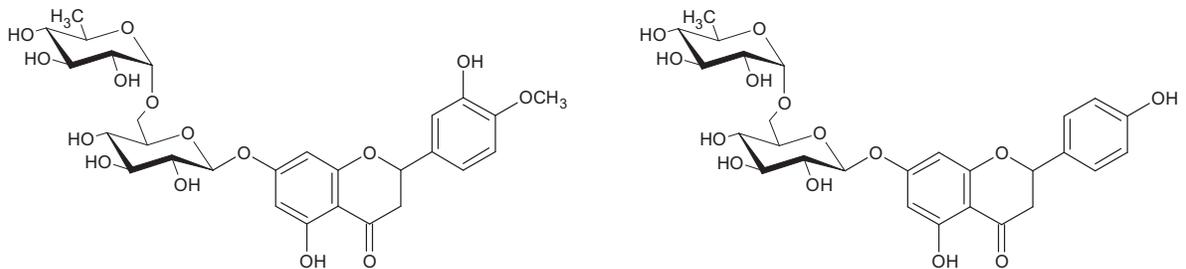


Figura 11. Estruturas da hesperidina (esquerda) e da narirutina (direita).

6. Manga

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é proveniente do sul da Ásia (Índia e arquipélago Malaio) e pertence à família Anacardiaceae. Esta planta foi trazida para o Brasil no século XVI pelos portugueses (Pinto, Silva, & Pinto, 2009). A mangueira é uma árvore de porte médio, com copa simétrica e frutos do tipo drupa (contém somente uma semente), de tamanho, peso, forma e cor variáveis

(Santos-Serejo, 2005). A cultivar Haden (Figura 12) foi desenvolvida no estado da Flórida nos Estados Unidos da América na década de 1910 (Knight & Schnell, 1994). Esta cultivar foi introduzida no Brasil na década de 1930 pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e se tornou a primeira cultivar americana cultivada comercialmente no Brasil (Soares et al., 2010).



Figura 12. Manga Haden (*Mangifera indica* L. cv. Haden).

A produção mundial de manga em 2011 foi de 38,95 milhões de toneladas, na qual a Índia destacou-se como o maior produtor, com 15,19 milhões de toneladas, o que corresponde a 39% da produção mundial. O Brasil ocupou a 8ª colocação com uma produção de 1,24 milhões de toneladas (FAO, 2014). O estado da Bahia destaca-se como principal produtor nacional, sendo responsável por 36% da produção (IBGE, 2012).

A manga é um fruto com alto teor de carotenoides, o que pode variar de 12,5 a 55,0 $\mu\text{g/g}$ de polpa dependendo da cultivar, estágio de maturação e origem geográfica (Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1998). Vários trabalhos na literatura relataram a composição de carotenoides de diversas cultivares de manga, e apesar das diferenças relativas a cada cultivar, todas apresentam em comum a all-

trans-violaxantina, a 9-*cis*-violaxantina e o all-*trans*- β -caroteno (figura 7), como carotenoides majoritários (Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1998; Ornelas-Paz, Yahia, & Gardea-Bejar, 2007, 2008; Pott, Breithaupt, & Carle, 2003).

7. Extração assistida por micro-ondas

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas localizadas na faixa de frequência entre 300 MHz e 300 GHz, o que corresponde a comprimentos de onda de 1 m a 1 mm, respectivamente. Os equipamentos de micro-ondas domésticos e industriais operam, em geral, a uma frequência de 2,45 GHz, que corresponde a um comprimento de onda de 12,2 cm e uma energia de $1,02 \times 10^{-5}$ eV, escolhida para evitar interferências com aparelhos de telecomunicação (Hayes, 2002; Jacob, Chia, & Boey, 1995).

O princípio de aquecimento através das micro-ondas baseia-se no efeito deste tipo de energia sobre as moléculas por meio da rotação dipolar e da condução iônica. A rotação dipolar significa o realinhamento dos dipolos com o campo elétrico aplicado, e este movimento molecular resulta em aquecimento. A condução iônica ocorre se há íons livres ou espécies iônicas no material a ser aquecido, e corresponde à movimentação dos íons quando as moléculas tentam se orientar de acordo com a rápida mudança no campo elétrico; resultando também em aquecimento da solução (Hayes, 2002).

A geração de calor durante a extração assistida por micro-ondas depende da força do campo eletromagnético e do fator de dissipação ($\tan \delta$) da mistura (amostra e solvente). Este fator representa a capacidade do material de converter energia eletromagnética em calor a uma dada frequência e temperatura, e é expresso pela relação entre a perda dielétrica (ϵ'') e a constante dielétrica (ϵ') (Eq.

1). A perda dielétrica representa a eficiência em dissipar a energia eletromagnética na forma de calor, e a constante dielétrica expressa a capacidade do material em ser polarizado por um campo elétrico externo (Kappe, Stadler, & Dallinger, 2012; Leonelli, Veronesi, & Cravotto, 2013). A Tabela 1 apresenta as propriedades dielétricas de alguns solventes.

$$\tan \delta = \varepsilon''/\varepsilon' \quad \text{Eq. 1}$$

Moléculas polares e soluções iônicas aquecem mais quando submetidas às micro-ondas do que moléculas apolares, pois absorvem a energia das micro-ondas mais fortemente em virtude de possuírem um momento dipolar permanente, o qual será afetado pelas micro-ondas (Eskilsson & Björklund, 2000).

Tabela 1. Constante dielétrica (ε'), fator de dissipação ($\tan \delta$) e perda dielétrica (ε'') para solventes a 2450 MHz e à temperatura ambiente¹.

Solvente	Constante dielétrica (ε')	Perda dielétrica (ε'')	Fator de dissipação ($\tan \delta$)
Água	80,4	9,889	0,123
Acetona	20,7	1,118	0,054
Metanol	32,6	21,483	0,659
Etanol	24,3	22,866	0,941
Clorofórmio	4,8	0,437	0,091
Acetato de etila	6,0	0,354	0,059
DMSO	45,0	37,125	0,825

¹Extraído de Hayes (2002).

Por outro lado, a utilização de solventes com baixa constante dielétrica pode ser vantajosa em alguns casos, permitindo a extração dos solutos para o solvente em baixa temperatura preservando-os da degradação térmica. Neste caso, a matriz deve ser capaz de absorver as micro-ondas e convertê-las em calor; no caso de amostras secas, isto pode ser conseguido por meio da adição de água à amostra (Camel, 2000).

Na extração assistida por micro-ondas, além do tipo de solvente utilizado, fatores como tempo de irradiação, potência empregada e temperatura exercem elevada influência nos resultados da extração. Em relação ao tempo de irradiação, o aumento do tempo tende a aumentar o rendimento até o ponto em que ocorre a estabilização, o que indica que máxima extração foi atingida, ou pode ocorrer diminuição do rendimento, indicando possível degradação dos analitos. O mesmo é observado para a potência, a qual está diretamente relacionada à temperatura empregada, ou seja, o aumento da potência utilizada, também resulta em aumento da temperatura do solvente (o que eleva a sua capacidade de solubilização devido à diminuição da viscosidade e da tensão superficial) e da amostra (o que aumenta a pressão celular causando ruptura da célula e extravazamento do conteúdo para o solvente). No entanto, este aumento é limitado até o ponto em que o rendimento decai devido à termodecomposição dos analitos (Chan et al., 2011; Routray, & Orsat, 2012).

Para que o aquecimento da amostra seja eficiente é necessário que o recipiente utilizado para extração seja "transparente" às micro-ondas, permitindo que as ondas o atravessem sem atenuá-las de forma significativa e cheguem à

amostra. Os principais materiais utilizados para este fim são o politetrafluoretileno (PTFE) e o quartzo (Leonelli, Veronesi, & Cravotto, 2013).

7.1. Compostos fenólicos

A extração assistida por micro-ondas tem sido largamente empregada para extração de compostos fenólicos em diversos materiais de origem vegetal (Li et al., 2011; Liazid et al., 2010; Proestos & Komaltis, 2008; Vuong et al., 2012). Esta técnica tem sido demonstrada como segura para este tipo de compostos, uma vez que estes são relativamente termoestáveis, não sendo observada redução significativa na recuperação dos compostos extraídos a 100 °C por 20 minutos (Liazid et al., 2007). Entretanto, vale ressaltar que em relação a suscetibilidade das diferentes classes de compostos fenólicos à degradação térmica, quanto maior o número de grupos hidroxila, mais suscetível é a estrutura, enquanto que a presença de açúcares e grupos metoxila exercem efeito protetor à estrutura (Biesaga, 2011).

Apesar dos diversos trabalhos na literatura relatarem que a extração por micro-ondas resulta em maior rendimento de compostos fenólicos, não há referências que tratem da extração exaustiva dos compostos fenólicos para sua real quantificação em diferentes matrizes, isto é, não há comprovação de que os analitos foram totalmente extraídos, especialmente quando a amostra é extraída uma única vez, seja pelo métodos convencionais (imersão, maceração e percolação), seja por meio das micro-ondas.

7.2. Carotenoides

A extração de carotenoides por micro-ondas é um assunto ainda pouco explorado e em virtude da sua labilidade térmica o desenvolvimento de métodos para extração deste composto exige maior atenção com relação a escolha dos parâmetros de extração para evitar ou minimizar alterações na composição de carotenoides da matriz. Estudos utilizando aparelhos de micro-ondas domésticos ou ainda equipamentos para laboratório mais antigos, nos quais não é possível o controle de temperatura, relatam perdas e alteração na composição de carotenoides com a formação de isômeros (Chen & Chen, 1993; Zhao et al., 2006).

Trabalhos recentes têm mostrado as limitações na utilização das micro-ondas para extração de carotenoides. Fratianni, Cinquanta e Panfili (2010) utilizaram as micro-ondas para pasteurização de suco de laranja e observaram que o aquecimento a 60 °C por 10 minutos resultou em perda de 36% dos carotenoides totais. Nesta extração, os epóxidos violaxantina e anteraxantina foram os mais afetados, mas não foi observado o aparecimento de isômeros. Em outro estudo, Pasquet et al. (2011) observaram que a utilização de 50 W de potência por 5 minutos foi eficiente para extração de fucoxantina a partir de 50 mg de células liofilizadas de *Dunaliella tertiolecta* e *Cylindrotheca closterium*. Estes autores relatam ainda que a extração utilizando potências maiores resultou em perdas de fucoxantina. Neste estudo também não relatada a ocorrência de isomerização.

Referências Bibliográficas

- AlHazimi, H. M. G., & Alkathlan, H. Z. (1996). Naturally occurring iridoids during the period 1990-1993. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 18(4), 336-357.
- Almeida, C. O., & Passos, O. S. (2011). *Citricultura brasileira: em busca de novos rumos desafios e oportunidades na região Nordeste*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura.
- Andrés-Lacueva, C., Medina-Rejon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., Zamora-Ros, R., Rotches-Ribalta, M., & Lamuela-Raventós, R. M. (2010). Phenolic compounds: chemistry and occurrence in fruits and vegetables. In L. A. de la Rosa, E. Alvarez-Parrilla & G. A. González-Aguilar (Eds.), *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability* (pp. 53-58). Ames: Wiley-Blackwell.
- Bianco, A. (1994). Recent developments in iridoids chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, 66(10-11), 2335-2338.
- Biesaga, M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218(18), 2505-2512.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb Journal*, 9(15), 1551-1558.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2004). *Carotenoids: handbook*. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Camel, V. (2000). Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 19(4), 229-248.

- Carvalho, J. E. U., Nascimento, W. M. O., & Müller, C. H. (1998). Características físicas e de germinação de sementes de espécies frutíferas nativas da Amazônia. *Embrapa-CPATU. Boletim de Pesquisa*, 203.
- Cavalcante, P. B. (1991). *Frutas comestíveis da Amazônia* (5ª ed.). Belém: CEJUP/Museu Paraense Emílio Goeldi.
- Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G. C., & Kung, F. W. L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6213-6225.
- Chen, B. H., & Chen, Y. Y. (1993). Stability of chlorophylls and carotenoids in sweet potato leaves during microwave cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(8), 1315-1320.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001-1043.
- De Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.
- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A. R., & Paredes-Lopez, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173-289.
- DellaPenna, D. (1999). Carotenoid synthesis and function in plants: insights from mutant studies in *Arabidopsis thaliana*. In H. A. Frank, A. J. Young, G. Britton & R. J. Cogdell (Eds.), *The photochemistry of carotenoids* (Vol. 8, pp. 21-37). New York: Kluwer Academic Publishers.

- Dewick, P. M. (1997). The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Natural Product Reports*, 14(2), 111-144.
- Dhuique-Mayer, C., Caris-Veyrat, C., Ollitrault, P., Curk, F., & Amiot, M. J. (2005). Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2140-2145.
- Dinda, B., Chowdhury, D. R., & Mohanta, B. C. (2009). Naturally occurring iridoids, secoiridoids and their bioactivity. An updated review, part 3. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 57(8), 765-796.
- Dinda, B., Debnath, S., & Banik, R. (2011). Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An updated review, part 4. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 59(7), 803-833.
- Dinda, B., Debnath, S., & Harigaya, Y. (2007a). Naturally occurring iridoids. A review, part 1. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 55(2), 159-222.
- Dinda, B., Debnath, S., & Harigaya, Y. (2007b). Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A review, part 2. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 55(5), 689-728.
- Djerassi, C., Gray, J. D., & Kincl, F. A. (1960). Naturally occurring oxygen heterocyclics. IX. Isolation and characterization of genipin. *Journal of Organic Chemistry*, 25(12), 2174-2177.
- Donadio, L. C., Figueiredo, J. O., & Pio, R. M. (1995). *Variedades cítricas brasileiras*. Jaboticabal: FUNEP.
- Elnaggar, L. J., & Beal, J. L. (1980). Iridoids - a review. *Journal of Natural Products*, 43(6), 649-707.

- Eskilsson, C. S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- FAO. (2014). FAOSTAT. Retrieved jan/2014, from Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E>
- Faria, A. F., Mignone, R. A., Montenegro, M. A., Mercadante, A. Z., & Borsarelli, C. D. (2010). Characterization and singlet oxygen quenching capacity of spray-dried microcapsules of edible biopolymers containing antioxidant molecules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 8004-8011.
- Farré, G., Sanahuja, G., Naqvi, S., Bai, C., Capell, T., Zhu, C., & Christou, P. (2010). Travel advice on the road to carotenoids in plants. *Plant Science*, 179(1–2), 28-48.
- FDOC. (2013). *Citrus reference book*. Gainesville: Florida Department of Citrus - Economic and Market Research Department, University of Florida.
- Fратиanni, A., Cinquanta, L., & Panfili, G. (2010). Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. *Lwt-Food Science and Technology*, 43(6), 867-871.
- Guarnaccia, R., Madyastha, K. M., Tegtmeyer, E., & Coscia, C. J. (1972). Geniposidic acid, an iridoid glucoside from *Genipa americana*. *Tetrahedron Letters*(50), 5125-5127.
- Hayes, B. L. (2002). *Microwave synthesis: chemistry at the speed of light*. Metthews: CEM Publishing.
- Herrmann, K. M. (1995). The shikimate pathway - early steps in the biosynthesis of aromatic-compounds. *Plant Cell*, 7(7), 907-919.

- IBGE. (2012). *Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes* (Vol. 39). Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- IBGE. (2013). *Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil* (Vol. 26(7)). Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- Jacob, J., Chia, L. H. L., & Boey, F. Y. C. (1995). Thermal and nonthermal interaction of microwave-radiation with materials. *Journal of Materials Science*, 30(21), 5321-5327.
- Jensen, S. R., Gotfredsen, C. H., Harput, U. S., & Saracoglu, I. (2010). Chlorinated iridoid glucosides from *Veronica longifolia* and their antioxidant activity. *Journal of Natural Products*, 73(9), 1593-1596.
- Kappe, C. O., Stadler, A., & Dallinger, D. (2012). *Methods and principles in medicinal chemistry* (2nd ed.). Boschstr: Wiley-VCH.
- Knight, R. J., & Schnell, R. J. (1994). Mango introduction in Florida and the 'Haden' cultivar's significance to the modern industry. *Economic Botany*, 48(2), 139-145.
- Lee, H. S. (2004). Phenolic compounds in foods. In L. M. L. Nollet (Ed.), *Handbook of food analysis* (2nd ed., Vol. 3, pp. 657-715). Boca Raton: CRC Press.
- Leonelli, C., Veronesi, P., & Cravotto, G. (2013). Microwave-assisted extraction: an introduction to dielectric heating. In F. Chemat & G. Cravotto (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice* (pp. 1-14). New York: Springer.
- Li, Y. P., Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M., & Taylor, D. K. (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry*, 129(2), 570-576.

- Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., & Barroso, C. G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1140(1-2), 29-34.
- Liazid, A., Schwarz, M., Varela, R. M., Palma, M., Guillen, D. A., Brigui, J., Macias, F. A., & Barroso, C. G. (2010). Evaluation of various extraction techniques for obtaining bioactive extracts from pine seeds. *Food and Bioproducts Processing*, 88(C2-3), 247-252.
- Mcgarvey, D. J., & Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7(7), 1015-1026.
- Mercadante, A. Z., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1998). Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 128-130.
- Neves, M. F., Trombin, V. G., Milan, P., Lopes, F. F., Cressoni, F., & Kalaki, R. (2010). *Retrato da citricultura brasileira*. São Paulo: CitrusBR.
- Ono, M., Ishimatsu, N., Masuoka, C., Yoshimitsu, H., Tsuchihashi, R., Okawa, M., Kinjo, J., Ikeda, T., & Nohara, T. (2007). Three new monoterpenoids from the fruit of *Genipa americana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 55(4), 632-634.
- Ono, M., Ueno, M., Masuoka, C., Ikeda, T., & Nohara, T. (2005). Iridoid glucosides from the fruit of *Genipa americana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 53(10), 1342-1344.
- Ornelas-Paz, J. D., Yahia, E. M., & Gardea-Bejar, A. (2007). Identification and quantification of xanthophyll esters, carotenes, and tocopherols in the fruit of seven mexican mango cultivars by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-time-of-flight mass spectrometry [LC-(APCl(+))-MS]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6628-6635.

- Ornelas-Paz, J. D., Yahia, E. M., & Gardea, A. A. (2008). Changes in external and internal color during postharvest ripening of 'Manila' and 'Ataulfo' mango fruit and relationship with carotenoid content determined by liquid chromatography-APCl(+)-time-of-flight mass spectrometry. *Postharvest Biology and Technology*, 50(2-3), 145-152.
- Pasquet, V., Cherouvrier, J. R., Farhat, F., Thiery, V., Piot, J. M., Berard, J. B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J. P., & Picot, L. (2011). Study on the microalgal pigments extraction process: performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, 46(1), 59-67.
- Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2006). Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S66-S73.
- Pinto, C. A. d. Q., Silva, D. J., & Pinto, P. A. d. C. (2009). Mangueira. In L. A. Crisóstomo & A. Naumov (Eds.), *Aduando para alta produtividade e qualidade: fruteiras tropicais do Brasil* (pp. 125-145). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical.
- Pott, I., Breithaupt, D. E., & Carle, R. (2003). Detection of unusual carotenoid esters in fresh mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Kent'). *Phytochemistry*, 64(4), 825-829.
- Proestos, C., & Komaltis, M. (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *Lwt-Food Science and Technology*, 41(4), 652-659.
- Pupin, A. M., Dennis, M. J., & Toledo, M. C. F. (1998). Flavanone glycosides in Brazilian orange juice. *Food Chemistry*, 61(3), 275-280.

- Routray, W., & Orsat, V. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 409-424.
- Sampaio-Santos, M. I., & Kaplan, M. A. C. (2001). Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12, 144-153.
- Sandmann, G. (2001). Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 4-12.
- Santos-Serejo, J. A. d. (2005). Classificação e descrição bontânica. In M. E. C. Pereira, N. Fonseca & F. V. D. Souza (Eds.), *Manga: o produtor pergunta, a Embrapa responde* (pp. 15-18). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.
- Shahidi, F., & Naczki, M. (2003). *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton: CRC Press.
- Shahidi, F., & Naczki, M. (2011). Analysis of polyphenols in foods. In S. Otle (Ed.), *Methods of analysis of food components and additives* (2nd ed., pp. 253-307). Boca Raton: CRC Press.
- Silva, D. B., Silva, J. A., Junqueira, N. T. V., & Andrade, L. R. M. (2001). *Frutas do cerrado*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.
- Silva, S., & Tassara, H. (2005). *Frutas Brasil frutas* (4th ed.). São Paulo: Empresa das Artes.
- Singh, R., Rastogi, S., & Dwivedi, U. N. (2010). Phenylpropanoid metabolism in ripening fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(4), 398-416.
- Soares, N. B., Martins, A. L. M., Ribeiro, I. J. A., Galli, J. A., Veiga, R. F. d. A., Carvalho, C. R. L., Narita, N., & Rossetto, C. J. (2010). *Recursos genéticos*

de mangueira na agência paulista de tecnologia dos agronegócios.
Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas

- Tallent, W. H. (1964). Two new antibiotic cyclopentanoid monoterpenes of plant origin. *Tetrahedron*, 20(7), 1781-1787.
- Taskova, R., Kokubun, T., & Alipieva, K. (2010). HPLC of iridoids. In M. Waksmundzka-Hajnos & J. Sherm (Eds.), *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis* (pp. 709-730). Boca Raton: CRC Press.
- Tomás-Barberán, F. A., & Clifford, M. N. (2000). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1073-1080.
- Tsai, T. R., Tseng, T. Y., Chen, C. F., & Tsai, T. H. (2002). Identification and determination of geniposide contained in *Gardenia jasminoides* and in two preparations of mixed traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A*, 961(1), 83-88.
- Ueda, S., Iwahashi, Y., & Tokuda, H. (1991). Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell-cultures. *Journal of Natural Products*, 54(6), 1677-1680.
- UNCTAD. (2005). *Market brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species: Genipa americana*: United Nations Conference on Trade and Development / BioTrade Facilitation Programme.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Dordrecht: Springer.
- Villasenor, I. M. (2007). Bioactivities of iridoids. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 6(4), 307-314.

- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2-20.
- Vuong, Q. V., Tan, S. P., Stathopoulos, C. E., & Roach, P. D. (2012). Improved extraction of green tea components from teabags using the microwave oven. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(1), 95-101.
- Walter, M. H., & Strack, D. (2011). Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Natural Product Reports*, 28(4), 663-692.
- Yang, B., Liu, X., & Gao, Y. X. (2009). Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruits with response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 610-615.
- Zhao, L., Zhao, G., Chen, F., Wang, Z., Wu, J., & Hu, X. (2006). Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (all-*E*)-astaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8346-8351.

CAPÍTULO II

Influência do estágio de maturação na composição de iridoides e de compostos fenólicos de jenipapo (*Genipa americana* L.)

Ádria de Sousa Bentes, Adriana Zerlotti Mercadante

Artigo em preparação para ser submetido à revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

Influência do estágio de maturação na composição de iridoides e de compostos fenólicos de jenipapo (*Genipa americana* L.)

Ádria de Sousa Bentes, Adriana Zerlotti Mercadante

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada, pela primeira vez, a influência do estágio de maturação de frutos de jenipapo (*Genipa americana* L.) sobre o seu perfil de iridoides e compostos fenólicos. foram classificados em relação ao estágio de maturação de acordo com a força máxima de penetração e cor da superfície. A análise por HPLC-DAD-MSⁿ mostrou a presença de iridoides nas formas não glicosilada, glicosilada e acilada, além de ácidos clorogênicos. Foram identificados ao todo, 17 compostos nos dois estádios de maturação analisados. O geniposídeo foi o composto majoritário no jenipapo verde, representando mais de 70 % dos iridoides totais. O composto fenólico majoritário no estágio de maturação verde foi o ácido 5-cafeoilquínico. No jenipapo maduro, a genipina-gentiobiosídeo foi o composto majoritário no endocarpo (38 %). Os teores de iridoides totais foram maiores no fruto verde que no maduro e em relação as duas partes da frutas, a concentração foi maior no endocarpo do que no mesocarpo. Foi observada uma redução de mais de 90% nos teores de iridoides totais durante o amadurecimento do jenipapo. Não foram detectados compostos fenólicos no jenipapo maduro. Este fato pode explicar a ausência de formação de pigmento azul no jenipapo maduro.

Esta é a primeira vez que a composição de iridoides e de compostos fenólicos é relatada na literatura.

Palavras-chave: Metabólitos secundários, *Genipa americana* L., estágio de maturação, composição de alimentos, HPLC-DAD-MSⁿ.

1. Introdução

Os iridoides são metabólitos secundários de plantas do grupo das angiospermas e constituem o maior grupo de monoterpenos com esqueleto ciclopentano[C]pirano ¹ Estes compostos podem ser classificados em: simples ou não glicosilados (Figura 1a); glicosilados (Figura 1b) principalmente nas posições 1 e 5; secoiridoides que são originados a partir da clivagem do anel ciclopentano entre os carbonos 7 e 8 (Figura 1c); e bisiridoides que são resultantes da dimerização de iridoides e secoiridoides ^{2, 3}. Os iridoides podem ainda estar esterificados com ácidos, sendo os mais comuns, os derivados dos ácidos benzoico e cinâmico; e estas esterificações ocorrem principalmente nas posições 6, 8 e 10 ^{1, 4}.

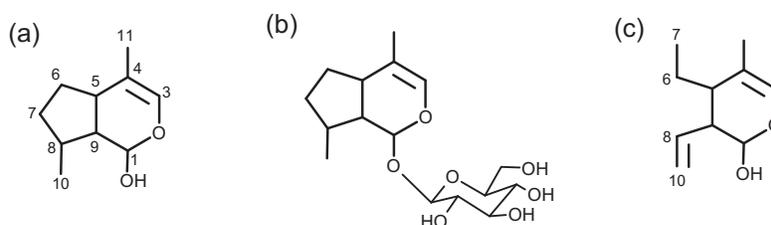


Fig. 1. Estruturas básicas dos iridoides: (a) simples, (b) glicosilado, (c) secoiridoide.

Os iridoides são utilizados como marcadores quimiotaxonômicos de classificação vegetal ⁵. Além disso, alguns destes compostos apresentam a capacidade de reagir com aminoácidos ou proteínas e formar pigmentos ⁶. Dentre os iridoides com esta propriedade, destaca-se a genipina, que através da reação com fontes de aminas primárias, produz o "pigmento azul" ⁷. Indústrias

alimentícias da Coréia do Sul e do Japão utilizam o pigmento azul em produtos como balas, sorvetes, condimentos, licores, produtos de panificação, etc.^{6, 8}.

A genipina pode ser obtida através da hidrólise do geniposídeo, que é a sua forma glicosilada, por meio da enzima β -glucosidase⁹. O geniposídeo já foi encontrado no jenipapo (*Genipa americana* L.) e no jasmim do cabo (*Gardenia jasminoides*), ambos são plantas da família *Rubiaceae*¹⁰⁻¹². O jenipapo é uma fruta nativa da Amazônia e que também pode ser encontrada em áreas tropicais e subtropicais da América Latina¹³. O jenipapo no estágio de maturação verde é muito utilizado pelos índios brasileiros para obtenção do pigmento azul, por meio da exposição do interior dos frutos ao oxigênio. Os índios empregam o pigmento azul em pinturas corporais, de tecidos e de diversos objetos^{14, 15}.

A composição de iridoides e de compostos fenólicos em jenipapo nunca foram relatados, e não há informações na literatura para o fato de formar pigmento azul apenas no fruto verde. Considerando o exposto acima, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do estágio de maturação do jenipapo no seu perfil de iridoides e compostos fenólicos.

2. Materiais e métodos

2.1. Padrões e reagentes

Os padrões de genipina e de ácido 5-cafeoilquínico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Os padrões apresentaram 99% de pureza, a qual foi determinada por HPLC-DAD. O metanol e a acetonitrila de grau HPLC foram adquiridos da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ). A água ultrapura foi obtida por meio do sistema Milli-Q (Billerica, MA). O metanol de grau analítico foi adquirido da Synth (São Paulo, Brasil). O reagente de Folin-Ciocalteu foi adquirido da Dinâmica

(São Paulo, Brasil). As amostras e os padrões foram filtrados em membrana Millipore de 0,22 μm .

2.2. Materiais

Os frutos de jenipapo foram coletados no campus da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) localizado no município de Campinas (São Paulo, Brasil). A exsicata da planta utilizada foi depositada no Herbário da UNICAMP (UEC 11713). A localização da planta corresponde às seguintes coordenadas: latitude 22°49'88", longitude 47°04'21" e altitude de 606 m

Foram coletados 3 lotes de frutas, com um intervalo de 10 dias entre as coletas, nos meses de janeiro e fevereiro de 2013. Os três lotes foram agrupados para formar uma amostra composta. Os jenipapos foram lavados manualmente e descascados; as porções do mesocarpo e do endocarpo foram separadas e congeladas imediatamente com nitrogênio líquido. Em seguida, foram liofilizadas (Liobras, São Paulo, Brasil), trituradas em processador de alimentos doméstico e embaladas a vácuo em sacos de polietileno. As amostras foram armazenadas em freezer a -36 °C até o momento das análises.

2.3. Diferenciação entre frutos verdes e maduros

Os frutos verdes e maduros foram diferenciados através das análises de força máxima de penetração (MPS) e cor da casca dos frutos, por serem minimamente invasivas, uma vez que a exposição do interior dos frutos verdes ao oxigênio leva à formação de pigmento azul. Todos os frutos utilizados no estudo foram submetidos às análises de MPS e de cor.

A MPS foi determinada utilizando um texturômetro TA-XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, Inglaterra), com uma *probe* de agulha (P/2N). A MPS foi determinada em duas faces opostas da região equatorial da cada fruto. Foram utilizadas as seguintes velocidades de perfuração: 5 mm/s na fase pré-teste; 2 mm/s na fase teste; e 10 mm/s na fase pós-teste, até a profundidade de 10 mm no fruto. Os resultados foram expressos em Newton (N). Foram considerados como frutos verdes aqueles que apresentaram MPS acima de 10 N, e frutos maduros, os que apresentaram MPS abaixo de 2 N. Frutos com valores de MPS intermediários foram descartados.

A cor dos frutos foi determinada em 4 pontos equidistantes da região equatorial. Foi utilizado um espectrocolorímetro (Hunter, ColorQuest XE, Reston, VA) calibrado no modo reflectância, com especular excluída, utilizando iluminante D65 e ângulo de observação de 10°. Foram determinados os parâmetros L^* , a^* e b^* , do sistema de cor CIELAB.

2.4. Análise da composição proximal

Foi determinada a composição proximal do mesocarpo e do endocarpo de jenipapo nos estádios de maturação verde e maduro. As análises de sólidos totais, cinzas, proteínas totais (fator 6,25 para conversão de nitrogênio total em proteína total), pH e sólidos solúveis foram realizadas de acordo com a AOAC ¹⁶, através dos métodos nº 920.151, 940.26, 920.152, 943.02 e 932.12, respectivamente. O teor de lipídios totais foi determinado de acordo com Bligh and Dyer ¹⁷. O teor de carboidratos foi estimado pela diferença entre o somatório dos teores de sólidos totais, cinzas, proteínas e lipídios ¹⁸. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados das análises de composição proximal foram expressos em g/100 g de matéria fresca. O valor energético total foi calculado de acordo com a FAO ¹⁸, considerando os seguintes fatores específicos para frutas: valor energético total (kcal/100g) = (porcentagem de proteína x 3,36 kcal/g) + (porcentagem de lipídios x 8,37 kcal/g) + (porcentagem de carboidratos x 3,60 kcal/g).

2.5. Determinação da composição de iridoides

A extração dos iridoides e dos compostos fenólicos foi realizada em tubo de teflon utilizando 0,4 g de amostra e 20 mL de solução metanol:água [8:2(v/v)] através da agitação em *vortex* (Phoenix Luferco, AP56, São Paulo, Brasil) por 5 min à temperatura ambiente (22 ± 3 °C). Em seguida, foi realizada a centrifugação (Beckman Coulter, Allegra 64R, Palo Alto, CA) a 22000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e uma nova alíquota de solvente foi adicionada ao tubo para repetição do procedimento até extração exaustiva. A confirmação da exaustão da amostra foi realizada qualitativamente utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, para o qual, compostos fenólicos e iridoides reagem. Ao final, os sobrenadantes das extrações foram combinados, formando um único extrato, o qual foi aferido em balão volumétrico com o mesmo solvente de extração.

Os iridoides foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em equipamento da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com bomba quaternária (LC-20AD), desgaseificador (DGU-20A5), válvula de injeção Rheodyne com *loop* de 20 µL e detectores de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M20A) e espectrômetro de massas (MS) (AmaZon speed ETD, Bruker Daltonics,

Bremen, Alemanha) com fonte de ionização *electrospray* (ESI) e analisador de massa/carga (m/z) *ion trap*.

A separação dos compostos foi realizada em coluna C₁₈ Synergi Hydro RP80A (4 µm, 250 x 4.6 mm i.d.) (Phenomenex, Torrance, CA), a uma vazão de 0.9 mL/min e temperatura da coluna de 29 °C, utilizando como fase móvel água (A) e acetonitrila (B), ambos contendo 0.1 % de ácido fórmico (v/v), em um gradiente linear (v/v) de A:B 99:1 para 50:50 em 50 min, depois para 1:99 em 5 min, mantendo esta proporção por 5 min, voltando para 99:1 em 5 min e mantendo esta proporção por 10 min para re-equilíbrio da coluna ¹⁹. Para análise no MS, o fluxo proveniente do DAD foi dividido, permitindo a entrada de somente 0.15 mL/min na fonte ESI. O MS foi configurado com os seguintes parâmetros: modo de ionização negativo; voltagem no capilar, 2 kV; voltagem na saída do capilar, -110 V; *skimmer* 1: 10 V, *skimmer* 2: 5 V; *end plate offset*, -500 V; temperatura do gás de secagem (N₂), 310 °C; vazão, 5 L/min; nebulizador, 30 psi. A energia de fragmentação para obtenção do MS/MS foi de 1,5 V ¹⁹. Os espectros UV-visível foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas foram processados em 250 e 320 nm. A faixa de varredura para os espectros de massas foi de m/z 100 a 1000.

Os iridoides e os compostos fenólicos foram identificados a partir dos seguintes parâmetros: ordem de eluição e tempo de retenção em coluna C₁₈, características dos espectros UV-visível e de massas comparados a padrões nas mesmas condições e a informações na literatura ²⁰⁻²⁶. A quantificação dos iridoides foi realizada a partir de uma curva analítica externa de genipina (0,5 a 100 µg/mL) com limites de detecção de 0,75 µg/mL e de quantificação de 2,25 µg/mL. Os compostos fenólicos foram quantificados a partir de uma curva analítica externa de

ácido 5-cafeoilquínico (0,5 a 55 µg/mL) com limites de detecção de 0,85 µg/mL e de quantificação de 2,34 µg/mL. As duas curvas mostraram-se lineares ($r^2 = 0,99$). Os limites de detecção e de quantificação foram calculados a partir dos parâmetros da curva analítica (desvio padrão e coeficiente angular) ²⁷.

2.6. Análise estatística dos resultados

Gráficos, médias e desvios-padrão dos resultados das análises por HPLC foram obtidos utilizando o software Origin versão 8. A comparação entre as médias das amostras (endocapo e mesocarpo nos estádios de maturação verde e maduro) foi realizada através da análise de variância (ANOVA), complementada pelo Teste Tukey, quando detectadas diferenças significativas. Foi utilizado um intervalo de confiança de 95 %. Os resultados obtidos pela análise de força máxima de penetração e os parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) foram utilizados como variáveis para a análise de componentes principais (PCA) utilizando o software Statistica versão 12.

3. Resultados e discussão

3.1. Diferenças entre frutos verdes e maduros

Os resultados médios de força máxima de penetração e de cor da casca encontram-se na Tabela 1. Na PCA (Fig. 2), as duas primeiras componentes principais (PC) descreveram 93,73 % da variância. A PC 1 descreveu 60,80 % da variância. Nesta PC, a MPS e o parâmetro de cor a^* apresentaram maior peso na discriminação das amostras (Fig. 2a) sendo estes parâmetros os principais responsáveis pela classificação dos frutos em verdes ou maduros (Fig. 2b). De acordo com o parâmetro a^* , os frutos maduros apresentaram uma casca tendendo mais para o amarelo do que os frutos verdes. A PC 2 foi responsável por 33,73 % da variância dos dados e as variáveis que apresentaram maior influência nesta PC foram os parâmetros de cor L^* e b^* . Os frutos foram agrupados com sucesso de acordo com o grau de maturação por meio dos parâmetros avaliados.

Tabela 1

Força máxima e parâmetros CIELAB dos jenipapos verdes e maduros.

Parâmetro	Verde	Maduro
Força máxima (N)	13,78 ± 1,65	0,57 ± 0,21
L^*	51,73 ± 0,92	47,29 ± 4,90
a^*	-2,80 ± 0,76	9,21 ± 1,67
b^*	20,74 ± 1,33	23,44 ± 3,40

Resultados expressos como média ± desvio-padrão (n = 45).

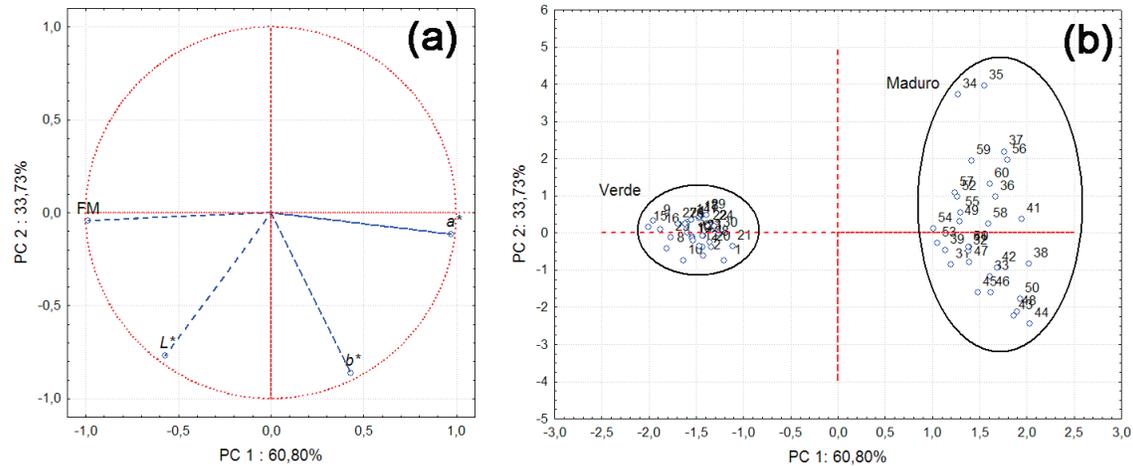


Fig. 2. Análise de componentes principais dos jenipapos em diferentes estádios de maturação. (a) gráfico de *loadings* das variáveis em relação a PC1 e PC2. (b) gráfico de *scores* para os frutos analisados.

Após a classificação, foram determinados o peso (g) e as dimensões (mm) dos frutos nos dois estádios de maturação. Os frutos verdes apresentaram as seguintes características físicas: massa $96,39 \pm 14,92$ g (n = 45); diâmetro longitudinal $59,11 \pm 3,31$ mm (n = 45) e diâmetro transversal $57,90 \pm 3,03$ mm (n = 45). As características dos frutos maduros foram: massa $141,40 \pm 19,75$ g (n = 45); diâmetro longitudinal $78,06 \pm 4,67$ mm (n = 45) e diâmetro transversal $58,97 \pm 2,88$ mm (n = 45).

3.2. Composição proximal

Os principais constituintes do jenipapo são água e carboidratos, independentemente do estágio de maturação e da parte do fruto (endocarpo ou mesocarpo) (Tabela 2). Esta composição mostrou-se semelhante à de outras frutas amazônicas como cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), cajarana (*Spondias dulcis*), cutite (*Pouteria macrophylla*) e ingá (*Inga capitada*)²⁸.

Comparando-se os dois estádios de maturação, o estágio maduro apresentou teores significativamente maiores de sólidos solúveis em relação ao verde, e isto ocorre provavelmente devido à hidrólise do amido durante o amadurecimento, com consequente liberação de açúcares que se acumulam na matriz ²⁹. Vale ressaltar a redução significativa no pH com a maturação, fato que apesar de pouco comum pode ocorrer em algumas frutas, como a banana, devido o acúmulo de ácidos orgânicos ³⁰. Os resultados de sólidos solúveis e pH obtidos para o jenipapo maduro estão dentro da faixa de valores de frutos maduros de 11 genótipos de *Genipa americana* coletados na região do Recôncavo baiano (Bahia, Brasil) ³¹.

Tabela 2

Composição proximal do mesocarpo e do endocarpo de jenipapo nos estádios de maturação verde e maduro.

Parâmetro	Verde		Maduro	
	Mesocarpo	Endocarpo	Mesocarpo	Endocarpo
Umidade (g/100 g)	80,9 ± 0,1 ^a	85,7 ± 0,1 ^b	75,3 ± 0,1 ^c	70,2 ± 0,7 ^d
Cinzas (g/100 g)	0,5 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,0 ^a	0,7 ± 0,0 ^b	0,8 ± 0,0 ^c
Proteínas (g/100 g)	1,6 ± 0,1 ^a	1,8 ± 0,2 ^a	0,7 ± 0,1 ^b	0,7 ± 0,1 ^b
Lipídios (g/100 g)	1,2 ± 0,3 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,0 ^b	2,1 ± 0,1 ^c
Carboidratos (g/100 g)	15,8 ± 0,3 ^a	10,5 ± 0,1 ^b	22,7 ± 0,2 ^c	26,2 ± 0,8 ^c
Valor energético total (Kcal/100 g)	72,6 ± 1,5 ^a	56,3 ± 0,7 ^b	89,1 ± 0,2 ^c	114,6 ± 2,0 ^d
Sólidos solúveis (° BRIX)	11,3 ± 0,3 ^a	12,1 ± 0,2 ^a	24,6 ± 1,1 ^b	23,3 ± 1,2 ^b
pH	4,7 ± 0,1 ^a	5,6 ± 0,1 ^b	3,7 ± 0,1 ^c	3,7 ± 0,1 ^c

Médias com a mesma letra minúscula sobrescrita na mesma linha não apresentam diferença significativa entre si ($P > 0,05$).

3.3. Composição de iridoides

Foram separados por HPLC ao todo, 18 compostos (14 iridoides, 3 compostos fenólicos e 1 não identificado) no jenipapo verde e maduro (Figura 3). Destes compostos, 2 tiveram a identidade confirmada com padrão, enquanto 15 foram tentativamente identificados considerando as suas características cromatográficas e espectroscópicas (Tabela 3), e 1 não foi identificado. Dos compostos identificados, 10 nunca haviam sido relatados em jenipapo. As estruturas dos compostos encontrados em jenipapo podem ser observadas na Figura 4.

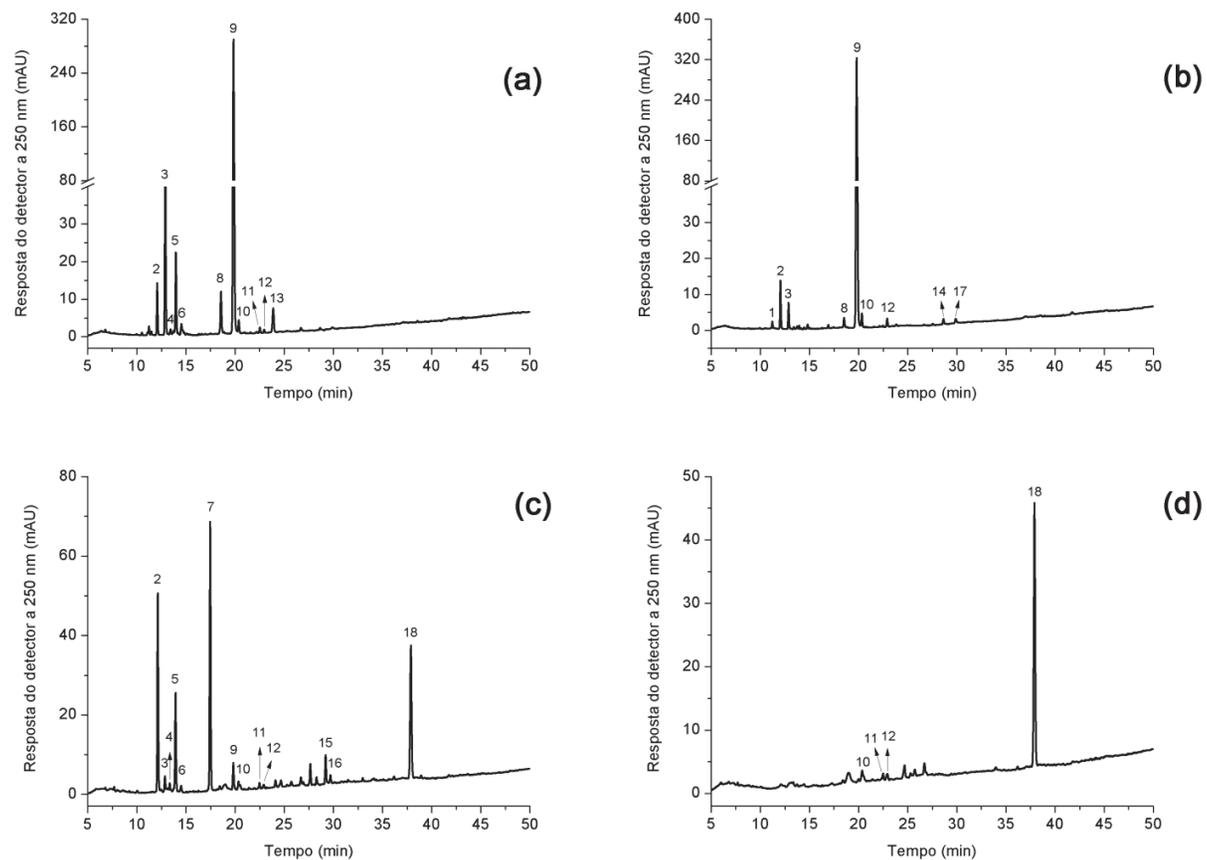


Figura 3. Cromatogramas, obtidos por HPLC-DAD, de iridoides e compostos fenólicos de jenipapo em dois estádios de maturação. Legenda: (a) endocarpo verde; (b) mesocarpo verde; (c) endocarpo maduro; (d) mesocarpo maduro. Condições cromatográficas: ver texto. A identificação dos picos está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3

Características cromatográficas e espectroscópicas dos iridoides e compostos fenólicos do jenipapo.

Pico ^a	Composto	t _R (min) ^b	λ _{máx} (nm) ^c	[M-H] ⁻ (m/z)	[M+HCOO] ⁻ (m/z)	MS/MS (-) (m/z) ^d	MS ³ (m/z)
1	Gardosídeo	11,2	235	373	n.d. ^e	211 [M-H-162] ⁻ , 193 [M-H-162-18]⁻ , 149 [M-H-162-44-18] ⁻ , 123 [M-H-162-44-44] ⁻	211→ 193 , 149, 123
2	Shanzhisídeo	12,0	235	391	n.d.	229 [M-H-162] ⁻ , 185 [M-H-162-44]⁻ , 167 [M-H-162-44-18] ⁻ , 149 [M-H-162-44-18-18] ⁻	229→ 185 , 167, 149
3	Ácido geniposídico	12,9	236	373	n.d.	211 [M-H-162]⁻ , 167 [M-H-162-44] ⁻ , 149 [M-H-162-44-18] ⁻ , 123 [M-H-162-44-44] ⁻	211→167, 149, 123
4	DAME ou SME ^f	13,4	241	n.d.	449	403 [M-H] ⁻ , 241 [M-H-162]⁻ , 223 [M-H-162-18] ⁻ , 139 [M-H-162-102] ⁻	403→ 241 , 223, 139
5	Gardenosídeo	13,9	241	n.d.	449	403 [M-H] ⁻ , 241 [M-H-162]⁻ , 223 [M-H-162-18] ⁻	403→ 241 , 223
6	DAME ou SME	14,5	241	n.d.	449	403 [M-H] ⁻ , 241 [M-H-162]⁻ , 223 [M-H-162-18] ⁻ , 139 [M-H-162-102] ⁻	403→ 241 , 139
7	Genipina-1-β-D- gentiobiosídeo	17,4	241	n.d.	595	549 [M-H]⁻ , 225 [M-H-162-162] ⁻	549→ 225
8	Ácido 5- cafeoilquínico	18,5	300 (sh), 328	353	n.d.	191 [M-H-162]⁻ , 179 [M-H-174] ⁻ , 173 [M-H-162-18] ⁻	191→ 173 , 127, 109
9	Geniposídeo	19,8	241	n.d.	433	387 [M-H] ⁻ , 225 [M-H-162]⁻ , 123 [M-H-162-102] ⁻	387→ 225 , 123
10	Ácido cafeoil- geniposídico	20,4	298 (sh), 328	535	n.d.	491 [M-H-44] ⁻ , 323 [M-H-212]⁻ , 161 [M-H-212-162] ⁻	323→179 [M-H-212-144] ⁻ , 161
11	Ácido <i>p</i> -cumaroil- geniposídico	22,5	294 (sh), 313	519	n.d.	307 [M-H-212]⁻ , 187, 163 [M-H-212-144] ⁻ , 145 [M-H-212-162] ⁻	307→ 217 , 145

Tabela 3. Continuação.

12	Feruloil-gardosídeo	22,9	298 (sh), 328	549	n.d.	355 [M-H-194] ⁻ , 337 [M-H-194-18] ⁻ , 217 , 193 [M-H-212-144] ⁻ , 175 [M-H-212-162] ⁻	355→337, 217 , 193
13	Genipina	23,9	238	225	n.d.	207 [M-H-18] ⁻ , 123 [M-H-102]⁻ , 101	-
14	Ácido 3,5- dicafeoilquínico	28,7	302 (sh), 328	515	n.d.	353 [M-H-162]⁻ , 191 [M-H-162-162] ⁻	353→ 191 , 179 [M-H-162-174] ⁻ , 173 [M-H-162-162-18] ⁻
15	<i>p</i> -cumaroil genipina- gentiobiosídeo	29,2	296(sh), 313	695	n.d.	663, 469 [M-H-226]⁻ , 367 [M-H-226-102] ⁻ , 307 [M-H-226-102-60] ⁻ , 265, 235, 205	469→ 367 , 307, 265, 235, 163 [M-H-226-162-144] ⁻ , 145 [M-H-226-180] ⁻
16	Feruloil genipina- gentiobiosídeo	29,7	296(sh), 328	725	n.d.	693, 499 [M-H-226]⁻ , 397 [M-H-226-102] ⁻ , 337 [M-H-226-102-60] ⁻ , 295, 265, 235	499→ 397 , 295, 265, 235, 193 [M-H-226-162-144] ⁻ , 175 [M-H-226-180] ⁻
17	Ácido 4,5- dicafeoilquínico	29,9	302 (sh), 328	515	n.d.	353 [M-H-162]⁻ , 335 [M-H-162-18] ⁻ , 173 [M-H-162-162-18] ⁻	353→191, 179, 173 , 135 [M-H-162-174-44] ⁻
18	Não identificado	37,9	276	172	n.d.	156 , 131, 105	-

^a Numeração de acordo com os cromatogramas da Figura 3. ^b Tempo de retenção na coluna C₁₈. ^c Solvente: gradiente de água e acetonitrila, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. ^d Os íons em negrito representam o fragmento majoritário. ^e n.d.: não detectado. ^f DAME: Éster metílico do ácido desacetil asperulosídico. SME: Éster metílico do escandosídeo.

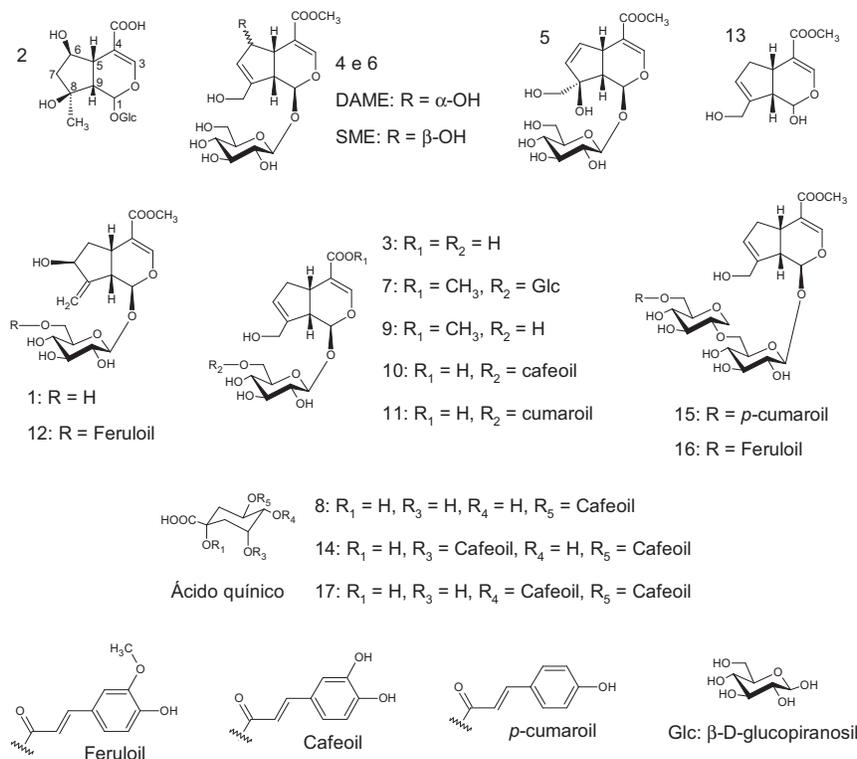


Figura 4. Estruturas químicas propostas para compostos encontrados em jenipapo. Os compostos estão numerados de acordo com a eluição na coluna C₁₈ (Tabela 3).

Os picos 1 e 3 apresentaram a mesma massa/carga para molécula desprotonada, além de fragmentação e absorção máxima no UV similares. Entretanto, no MS/MS os dois compostos diferenciaram quanto ao fragmento majoritário, sendo no pico 1 o íon de m/z 193 e no pico 3, a m/z 211. A diferença de massa entre estes fragmentos (18 u) é relativa à eliminação de uma molécula de água. Quando há uma hidroxila ligada ao carbono 8 ou ao carbono diretamente ligado ao carbono 8, forma-se uma ligação de hidrogênio com o oxigênio da ligação glicosídica, o que dificulta a perda deste oxigênio durante a fragmentação, e resulta em uma perda neutra de 162 u, como verificado no espectro do pico 3.

Na ausência desta hidroxila, a perda mais comum é de 180 u (pico 1). Além disso, o fragmento a m/z 149, resultante da perda de CO_2 (44 u), indica a presença do grupo carboxila nas duas moléculas. Assim, o pico 1 foi tentativamente identificado como gardosídeo e o pico 3, como ácido geniposídico, baseado na semelhança das características dos mesmos compostos encontrados em *Gardenia jasminoides*²⁰. Esta é a primeira vez que o composto gardosídeo é detectado em *Genipa americana* L.

O pico 2 apresentou $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 391 e perdas neutras correspondentes a uma unidade glicosídica (162 u), H_2O (18 u) e CO_2 (44 u). Este composto foi tentativamente identificado como shanzhisídeo. As mesmas características foram relatadas por Ren, Xue, Zhang, Wang, Liu, Li and Liang²¹ para o padrão deste composto.

Os picos 4, 5 e 6 apresentaram em comum a m/z 449 que no MS/MS, mostrou ser um aduto do $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 403 com o íon formato (HCOO^-) da fase móvel. Os três picos apresentaram absorção no UV e perfil de fragmentação semelhante. Entretanto, apenas os picos 4 e 6 apresentaram o fragmento de m/z 139, formado pela perda de 102 u, que corresponde a uma molécula de 3-oxopropanoato de metila. Esta perda resulta da clivagem do esqueleto básico dos iridoides glicosilados do tipo 7,8-ciclopenteno²². Assim, o composto 5 foi tentativamente identificado como gardenosídeo e os compostos 4 e 6 como ésteres metílicos do ácido desacetil asperulosídico (DAME) e do escandosídeo (SME). Entretanto, o DAME e o SME são epímeros e os métodos de detecção utilizados não permitem a distinção entre os dois, assim, não foi possível afirmar qual pico (4 ou 6) corresponde a cada isômero.

Os picos 7 e 9 também formaram adutos com o íon formato. No MS/MS, foram observados os íons correspondentes ao $[M-H]^-$ de m/z 549 e 387 para os picos 7 e 9, respectivamente. No MS³ da molécula desprotonada dos dois compostos, o fragmento de m/z 225 foi o majoritário em ambos e corresponde a aglicona genipina após a perda de um (pico 9) e dois grupos glicosídicos (pico 7). Com base no padrão de fragmentação, os picos 7 e 9 foram tentativamente identificados como genipina-1- β -D-gentiobiosídeo e geniposídeo, respectivamente, baseado nas características semelhantes dos mesmos compostos encontrados em *Gardenia jasminoides* Ellis²⁰. Estes compostos representam os iridoides majoritários nos frutos de gardenia²³.

O geniposídeo foi o composto majoritário no jenipapo verde, tanto no endocarpo, quanto no mesocarpo. A genipina-1- β -D-gentiobiosídeo foi o iridoide majoritário no endocarpo maduro, não sendo detectada no jenipapo verde. Isto indica que a maturação favorece a adição de um segundo grupo glicosídico ao geniposídeo dando origem a genipina-1- β -D-gentiobiosídeo.

O pico 8 foi identificado como ácido 5-cafeoilquínico por ter apresentado o mesmo tempo de retenção, características dos espectros UV e de massas, de um padrão autêntico de ácido 5-cafeoilquínico. Este pico apresentou uma molécula desprotonada de m/z 353 e os fragmentos MS/MS de m/z 191 e 179 gerados a partir das perdas dos grupos cafeoil e quinoil, respectivamente. Este é o primeiro trabalho a relatar a presença de ácidos clorogênicos em frutos de *Genipa americana* L.

Os picos 10 e 11 apresentaram $[M-H]^-$ de m/z 535 e 519, respectivamente. No MS/MS, os dois compostos apresentaram em comum os íons de m/z 323 e 307, como fragmentos majoritários. Estes fragmentos correspondem à perda de

212 u para os compostos 10 e 11, respectivamente. Esta perda pode corresponder a aglicona dos iridoides gardosídeo (pico 1) ou ácido geniposídico (pico 3). Considerando o mesmo princípio utilizado para diferenciação dos picos 1 e 3, a perda da aglicona inteira (212 u) é característica da presença de um grupo OH no carbono 8, o que significa que a aglicona em questão é a o ácido geniposídico.

No pico 10, o MS³ do íon de m/z 323 resultou nos fragmentos 179 u e 161 u, que correspondem respectivamente ao ácido cafeico ionizado e desidratado. No pico 11, o MS³ do íon de m/z 307, resultou nos fragmentos de m/z 217 e 145, que correspondem respectivamente à fragmentação de um grupo glicosídico e ao ácido *p*-cumárico ionizado. Desta forma, os compostos 10 e 11 foram tentativamente identificados como ácido cafeoil-geniposídico e ácido *p*-cumaroil-geniposídico, respectivamente. Até o momento, a presença de iridoides glicosídeos esterificados com ácidos em jenipapo nunca havia sido reportada na literatura.

O pico 12 apresentou como molécula desprotonada a m/z 549, e fragmentações (MS/MS) de m/z 355 [M-H-194]⁻ e 337 [M-H-194-18]⁻, relativas à perda da aglicona desidratada e não desidratada. Tendo em vista o que foi previamente discutido, esta fragmentação indica a ausência de grupo OH no carbono 8 ou no carbono diretamente ligado a este. Desta forma, a aglicona presente no composto 12 foi tentativamente identificada como a do gardosídeo. O MS³ do íon de m/z 355 produziu, além do íon de m/z 337 (perda de uma molécula de H₂O), o íon de m/z 193, que corresponde ao ácido ferúlico ionizado. Desta forma, o composto 12 foi tentativamente identificado como feruloil-gardosídeo.

O pico 13 foi identificado como genipina, pois apresentou mesmo tempo de retenção, características dos espectros UV e de massas de um padrão autêntico

de genipina. Este composto apresentou molécula desprotonada de m/z 225 e os seguintes fragmentos MS/MS: m/z 207 relativo à perda de uma molécula de água; m/z 123 gerado pela perda do grupo 3-oxopropanoato de metila (102 u) e m/z 101 que corresponde ao próprio grupo 3-oxopropanoato de metila ionizado.

Os picos 14 e 17 apresentaram o mesmo $[M-H]^-$ de m/z 515. No MS/MS, o fragmento de m/z 353, característico dos ácidos dicafeoilquínicos, foi majoritário em ambos os compostos. No MS³ do íon de m/z 353, a fragmentação para os dois compostos foi muito semelhante, diferindo apenas na intensidade do pico majoritário. O composto 14 apresentou o fragmento de m/z 191, como majoritário, resultante da perda de um grupo cafeoil (162 u). No composto 17, o fragmento majoritário foi o de m/z 173, que representa o ácido quínico desidratado. Os isômeros dos ácidos clorogênicos apresentam padrões de fragmentação que variam de acordo com a posição em que os grupos cafeoil se encontram ligados ao ácido quínico²⁵. Desta forma, os picos 14 e 17 foram tentativamente identificados como ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico, respectivamente. Estes ácidos clorogênicos, bem como o ácido 5-cafeoilquínico (pico 8) também foram encontrados em frutos de gardenia²⁴.

O pico 15 apresentou $[M-H]^-$ de m/z 695, e no MS/MS, o fragmento majoritário foi o íon de m/z 469, resultante da perda de uma molécula de genipina (226 u). O MS³ deste íon apresentou os fragmentos de m/z 367, 307, 265 e 235, característicos da fragmentação de duas moléculas de glicose, e ainda os fragmentos de m/z 163 e 145 que correspondem ao ácido *p*-cumárico ionizado e desidratado, respectivamente. A partir destas informações, o composto 15 foi tentativamente identificado como *p*-cumaroil genipina-gentiobiosídeo, o qual

também foi encontrado em uma formulação medicinal chinesa a base de frutos de gardenia e soja fermentada ²⁶.

O pico 16 foi tentativamente identificado como feruloil genipinagentiobiosídeo, pois apresentou uma diferença de 30 u em relação ao pico 18, mas com mesmo mecanismo de fragmentação. Neste caso, no entanto, foram obtidos os íons de m/z 193 e 175 no MS³, que representam o ácido ferúlico ionizado e desidratado, respectivamente.

O pico 18 não foi identificado, mas algumas características puderam ser observadas, como a absorção a 276 nm e um $[M-H]^-$ de m/z 172. Moléculas desprotonadas de m/z par indicam a presença de um número ímpar de nitrogênios na molécula. Além disso, o elevado tempo de retenção (37,9 min) deste composto indica baixa polaridade em relação aos demais. Este composto foi o majoritário encontrado no mesocarpo maduro.

A composição de iridoides e ácidos clorogênicos do jenipapo mostrou-se muito similar à relatada recentemente para frutos de *Gardenia jasminoides* ^{20, 32}. Assim como na gardenia, o geniposídeo foi o iridoide majoritário no jenipapo verde (Tabela 4), correspondendo a 72 % e 92 % dos iridoides totais do endocarpo e do mesocarpo, respectivamente. No entanto, os teores de geniposídeo encontrados no endocarpo e no mesocarpo do jenipapo verde (107,11 e 117,99 mg/g amostra liofilizada, respectivamente) foram superiores aos valores reportados para frutos de gardenia de diferentes variedades e origens (43,19 a 95,51 mg/g amostra seca) ^{12, 33}. Além disso, o jenipapo verde também apresentou maiores teores de ácido geniposídico (endocarpo e mesocarpo) e gardenosídeo (endocarpo) que os frutos de gardenia (0,80 e 1,08 mg/g amostra seca, respectivamente) ²³.

Tabela 4

Teores de iridoides e compostos fenólicos no endocarpo e no mesocarpo de jenipapo nos estádios de maturação verde e maduro.

Pico	Composto	Verde		Maduro	
		Endocarpo	Mesocarpo	Endocarpo	Mesocarpo
1	Gardosídeo ^a	n.d. ^c	0,76 ± 0,03	n.d.	n.d.
2	Shanzhisídeo ^a	4,34 ± 0,03	4,23 ± 0,04	1,64 ± 0,06	n.d.
3	Ácido geniposídico ^a	19,86 ± 0,09	2,54 ± 0,05	0,19 ± 0,01	n.d.
4	DAME ou SME ^a	0,80 ± 0,02	n.d.	0,11 ± 0,00	n.d.
5	Gardenosídeo ^a	7,05 ± 0,13	n.d.	0,90 ± 0,03	n.d.
6	DAME ou SME ^a	1,37 ± 0,05	n.d.	0,09 ± 0,00	n.d.
7	Genipina-1-β-D-gentiobiosídeo ^a	n.d.	n.d.	2,45 ± 0,13	n.d.
8	Ácido 5-cafeoilquínico ^b	5,59 ± 0,06	1,72 ± 0,03	n.d.	n.d.
9	Geniposídeo ^a	107,11 ± 0,74	117,99 ± 0,93	0,29 ± 0,01	n.d.
10	Ácido cafeoil-geniposídico ^b	1,34 ± 0,02	1,44 ± 0,02	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,00
11	Ácido <i>p</i> -cumaroil-geniposídico ^b	1,43 ± 0,02	n.d.	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,00
12	Feruloil-gardosídeo ^b	0,75 ± 0,01	1,12 ± 0,04	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,00
13	Genipina ^a	3,40 ± 0,11	n.d.	n.d.	n.d.
14	Ácido 3,5-dicafeoilquínico ^b	n.d.	1,23 ± 0,03	n.d.	n.d.
15	<i>p</i> -cumaroil genipina-gentiobiosídeo ^b	n.d.	n.d.	0,38 ± 0,00	n.d.
16	Feruloil genipina-gentiobiosídeo ^b	n.d.	n.d.	0,10 ± 0,01	n.d.
17	Ácido 4,5-dicafeoilquínico ^b	n.d.	1,22 ± 0,04	n.d.	n.d.
18	Não identificado ^a	n.d.	n.d.	1,76 ± 0,05	1,07 ± 0,00
Iridoides totais		147,45 ± 0,88	128,07 ± 1,09	6,43 ± 0,22	0,25 ± 0,00
Compostos fenólicos totais		5,59 ± 0,06	4,17 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Os picos foram quantificados como equivalentes a genipina ^a e a ácido 5-cafeoilquínico ^b. Valores de média ± desvio-padrão (n=3) expressos em mg/g de amostra liofilizada. ^c n.d = não identificado.

De acordo com a via biossintética dos iridoides, o ácido geniposídico é precursor do geniposídeo e este por sua vez origina o gardenosídeo ⁵. Estes três compostos são os majoritários no endocarpo verde e estão entre os principais do mesocarpo verde, mas pode-se observar através dos teores destes compostos, que no jenipapo verde, a rota mais favorecida é a de formação de geniposídeo.

Embora, o endocarpo tenha apresentado baixa concentração de genipina (3,40 mg/g de amostra liofilizada), foram observadas pequenas linhas de pigmento azul no endocarpo verde, as quais podem ser resultantes da reação entre aminoácidos ou proteínas e a genipina livre presente nessa parte da fruta. A permanência dos extratos de endocarpo e mesocarpo verde a temperatura ambiente por um tempo prolongado (algumas horas) resulta no aumento da intensidade (endocarpo) ou aparecimento (mesocarpo) do pico de genipina, redução do pico do geniposídeo e formação de pigmento azul no extrato. Este fato pode indicar a presença de enzima β -glicosidase na fruta, a qual hidrolisa a ligação glicosídica do geniposídeo liberando a aglicona, que pode reagir com fontes de aminas primárias presentes na matriz. A drástica redução dos teores de geniposídeo com a maturação pode explicar a não ocorrência e/ou formação de pigmento azul em frutos maduros.

Outra diferença observada entre os estádios de maturação foi a ausência de ácidos clorogênicos no jenipapo maduro. Além disso, o jenipapo maduro apresentou uma redução de mais de 90% nos teores de iridoides em relação ao jenipapo verde. Este comportamento também foi observado em frutos de *Gardenia jasmonoides*, no qual os teores de geniposídeo diminuíram ao longo do amadurecimento dos frutos ^{34, 35}. Nagatoshi, et al. ³⁶ observaram que os níveis de

expressão da enzima responsável pela glicosilação dos iridoides em *Gardenia jasminoides* são maiores nos primeiros estádios de maturação do fruto. Este fenômeno tem sido atribuído ao fato dos iridoides atuarem como compostos de defesa contra herbívoros. Os iridoides, enquanto monoterpenos exigem precursores de baixa massa molecular e baixa atividade enzimática, o que torna a sua síntese energeticamente favorável nos estágios iniciais do desenvolvimento ³⁷,
³⁸.

O presente trabalho foi o primeiro a relacionar a composição de iridoides e compostos fenólicos de jenipapo com o estágio de maturação e a porção da fruta (mesocarpo e endocarpo). De acordo com os dados obtidos o estágio de maturação influencia o perfil tanto de iridoides como de compostos fenólicos. O jenipapo verde mostrou-se uma ótima fonte de geniposídeo, o qual pode ser utilizado para produção de genipina e posterior obtenção de pigmento azul pela indústria de corantes naturais. Além disso, a constatação da quase inexistência de geniposídeo no jenipapo maduro pode explicar a não formação de pigmento azul no fruto deste estágio de maturação.

Agradecimentos

As autoras agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Referências

1. Dinda, B.; Debnath, S.; Harigaya, Y., Naturally occurring iridoids. A review, part 1. *Chem Pharm Bull* **2007**, *55*, 159-222.

2. Bianco, A., Recent developments in iridoids chemistry. *Pure Appl Chem* **1994**, *66*, 2335-2338.
3. Villasenor, I. M., Bioactivities of iridoids. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* **2007**, *6*, 307-314.
4. Al-Hazimi, H. M. G.; Alkathlan, H. Z., Naturally occurring iridoids during the period 1990-1993. *J Chem Soc Pakistan* **1996**, *18*, 336-357.
5. Sampaio-Santos, M. I.; Kaplan, M. A. C., Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2001**, *12*, 144-153.
6. Francis, F. J., Food colorings. In *Colour in Food: Improving Quality*, MacDougall, D. B., Ed. CRC Press: Boca Raton, 2002; pp 297-330.
7. Fujikawa, S.; Fukui, Y.; Koga, K.; Kumada, J., Brilliant skyblue pigment formation from gardenia fruits. *J Ferment Bioeng* **1987**, *65*, 419-424.
8. Park, J. E.; Lee, J. Y.; Kim, H. G.; Hahn, T. R.; Paik, Y. S., Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of *Gardenia jasminoides*. *J Agr Food Chem* **2002**, *50*, 6511-6514.
9. Paik, Y. S.; Lee, C. M.; Cho, M. H.; Hahn, T. R., Physical stability of the blue pigments formed from geniposide of gardenia fruits: Effects of pH, temperature, and light. *J Agr Food Chem* **2001**, *49*, 430-432.
10. Ono, M.; Ueno, M.; Masuoka, C.; Ikeda, T.; Nohara, T., Iridoid glucosides from the fruit of *Genipa americana*. *Chem Pharm Bull* **2005**, *53*, 1342-1344.
11. Ono, M.; Ishimatsu, N.; Masuoka, C.; Yoshimitsu, H.; Tsuchihashi, R.; Okawa, M.; Kinjo, J.; Ikeda, T.; Nohara, T., Three new monoterpenoids from the fruit of *Genipa americana*. *Chem Pharm Bull* **2007**, *55*, 632-634.
12. Yang, Q. J.; Fan, M. S.; Wu, B.; Sun, Z. L.; Cui, X. L.; Du, X. W.; Huang, C. G., Quality assessment for fructus *Gardeniae* by multi-component quantification,

chromatographic fingerprint and related chemometric analysis. *J Med Plants Res* **2011**, 5, 4126-4137.

13. UNCTAD, *Market brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species: Genipa americana*. United Nations Conference on Trade and Development / BioTrade Facilitation Programme: 2005.

14. Cavalcante, P. B., *Frutas comestíveis da Amazônia*. 5ª ed.; CEJUP/Museu Paraense Emílio Goeldi: Belém, 1991; p 279.

15. Djerassi, C.; Gray, J. D.; Kincl, F. A., Naturally occurring oxygen heterocyclics. IX. Isolation and characterization of genipin. *J Org Chem* **1960**, 25, 2174-2177.

16. AOAC, *Official Methods of Analysis*. 18th ed.; AOAC International: Gaithersburg, Maryland, 2005.

17. Bligh, E. G.; Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys* **1959**, 37, 911-917.

18. FAO, Food energy - methods of analysis and conversion factors. In *FAO Food and Nutrition Papers*, Rome, 2003; Vol. 77, pp 1-82.

19. Chisté, R. C.; Mercadante, A. Z., Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. *J Agr Food Chem* **2012**, 60, 5884-5892.

20. Zhou, T. T.; Liu, H.; Wen, J.; Fan, G. R.; Chai, Y. F.; Wu, Y. T., Fragmentation study of iridoid glycosides including epimers by liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization mass spectrometry and its application in metabolic fingerprint analysis of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Rapid Commun Mass Sp* **2010**, 24, 2520-2528.

21. Ren, L.; Xue, X. Y.; Zhang, F. F.; Wang, Y. C.; Liu, Y. F.; Li, C. M.; Liang, X. M., Studies of iridoid glycosides using liquid chromatography/electrospray

ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* **2007**, *21*, 3039-3050.

22. Li, C. M.; Zhang, X. L.; Xue, X. Y.; Zhang, F. F.; Xu, Q.; Liang, X. M., Structural characterization of iridoid glucosides by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* **2008**, *22*, 1941-1954.

23. Sheu, S. J.; Hsin, W. C., HPLC separation of the major constituents of Gardeniae Fructus. *Hrc-J High Res Chrom* **1998**, *21*, 523-526.

24. Clifford, M. N.; Wu, W. G.; Kirkpatrick, J.; Jaiswal, R.; Kuhnert, N., Profiling and characterisation by liquid chromatography/multi-stage mass spectrometry of the chlorogenic acids in Gardeniae Fructus. *Rapid Commun Mass Sp* **2010**, *24*, 3109-3120.

25. Clifford, M. N.; Johnston, K. L.; Knight, S.; Kuhnert, N., Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *J Agr Food Chem* **2003**, *51*, 2900-11.

26. Zhao, X.; Long, Z.; Dai, J.; Bi, K.; Chen, X., Identification of multiple constituents in the traditional Chinese medicine formula Zhi-zi-chi decoction and rat plasma after oral administration by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* **2012**, *26*, 2443-53.

27. ICH, *ICH Harmonised Tripartite Guideline - Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: 2005; p 13.

28. Aguiar, J. P. L., Table of nutrient composition of Amazonian foods. *Acta Amazonica* **1996**, *26*, 121-126.

29. Almeida, G. C.; Vilas Boas, E. V. B.; Rodrigues, L. J.; Paula, N. R. F., Ripening delay of 'Apple' banana submitted to 1-MCP, previously applied to refrigeration. *Revista Brasileira de Fruticultura* **2006**, *28*, 319-321.
30. Carvalho, A. V.; Seccadio, L. L.; Mourão Júnior, M.; Nascimento, W. M. O., Postharvest quality of 'maça' banana cultivars in Belém region - PA. *Revista Brasileira de Fruticultura* **2011**, *33*, 1095-1102.
31. Hansen, D. S.; Silva, S. A.; Fonseca, A. A. O.; Hansen, O. A. S.; França, N. O., Chemical characterization of native jenipapo fruits from the Recôncavo baiano region aiming in natura fruit consumption and industrialization. *Revista Brasileira de Fruticultura* **2008**, *30*, 964-969.
32. He, W. H.; Liu, X. A.; Xu, H. G.; Gong, Y.; Yuan, F.; Gao, Y. X., On-line HPLC-ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruit extracts. *Food Chem* **2010**, *123*, 521-528.
33. Tsai, T. R.; Tseng, T. Y.; Chen, C. F.; Tsai, T. H., Identification and determination of geniposide contained in *Gardenia jasminoides* and in two preparations of mixed traditional Chinese medicines. *J Chromatogr A* **2002**, *961*, 83-88.
34. Chen, Y.; Zhang, H.; Li, Y. X.; Cai, L.; Huang, J.; Zhao, C.; Jia, L.; Buchanan, R.; Yang, T.; Jiang, L. J., Crocin and geniposide profiles and radical scavenging activity of gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) from different cultivars and at the various stages of maturation. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 269-273.
35. Gao, L.; Zhu, B. Y., The accumulation of crocin and geniposide and transcripts of phytoene synthase during maturation of *Gardenia jasminoides* fruit. *Evid-Based Compl Alt* **2013**, *2013*, 6.
36. Nagatoshi, M.; Terasaka, K.; Nagatsu, A.; Mizukami, H., Iridoid-specific glucosyltransferase from *Gardenia jasminoides*. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 32866-32874.

37. Baby, S.; Raj, G.; Thaha, A. R. M.; Dan, M., Volatile chemistry of a plant: mono-sesquiterpenoid pattern in the growth cycle of *Curcuma haritha*. *Flavour Frag J* **2010**, *25*, 35-40.
38. Hosni, K.; Jemli, M.; Dziri, S.; M'rabet, Y.; Ennigrou, A.; Sghaier, A.; Casabianca, H.; Vulliet, E.; Ben Brahim, N.; Sebei, H., Changes in phytochemical, antimicrobial and free radical scavenging activities of the Peruvian pepper tree (*Schinus molle* L.) as influenced by fruit maturation. *Ind Crop Prod* **2011**, *34*, 1622-1628.

CAPÍTULO III

Desenvolvimento de um novo método de extração assistida por micro-ondas de compostos fenólicos de laranja

Ádria de Sousa Bentes, Fabio Yamashita, Adriana Zerlotti Mercadante

Artigo em preparação para ser submetido à revista *Food Chemistry*

Desenvolvimento de um novo método de extração assistida por micro-ondas de compostos fenólicos de laranja

Ádria de Sousa Bentes¹, Fabio Yamashita², Adriana Zerlotti Mercadante¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

² Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

RESUMO

Um novo método de extração de compostos fenólicos assistida por micro-ondas (MAE) foi desenvolvido e validado utilizando laranja [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera] com diferentes teores de umidades: congelada e seca. Para isso, foi realizado um planejamento experimental de face centrada, seguido pela otimização do volume de solvente e do tempo de análise. A MAE não provocou alterações no perfil de compostos fenólicos da amostra quando comparada com a extração convencional sólido-líquido (SLE). Foram identificados por HPLC-DAD-MSⁿ 5 compostos na polpa de laranja, sendo a hesperidina o majoritário, representando 90 % do total de compostos fenólicos presentes nas amostras. O método de MAE desenvolvido apresentou ótima repetibilidade, com desvio padrão relativo < 5 % e recuperação > 92 %; foi 2,5 vezes mais rápido, consumiu 75 % menos solvente e utilizou metade da massa de amostra em relação à SLE, além de permitir a extração de várias amostras simultaneamente.

Palavras-chave: Compostos bioativos, laranja Pera, flavonoides, extração assistida por micro-ondas.

1. Introdução

A cultura dos cítricos está entre as mais importantes do mundo. A produção mundial de laranjas em 2011 foi de mais de 69 milhões de toneladas, sendo o Brasil o maior produtor, responsável por 28,5% da produção mundial (FAO, 2014). Laranjas são importantes fontes de compostos fenólicos, especialmente flavonoides da classe das flavanonas (Crozier, Jaganath, & Clifford, 2009). No grupo das laranjas doces, no qual está incluída a espécie *Citrus sinensis*, as principais flavanonas encontradas são a hesperidina (hesperitina-7-O-rutinosídeo) e a narirutina (narigenina-7-O-rutinosídeo) (Peterson et al., 2006).

Os efeitos benéficos das flavanonas à saúde tem sido amplamente relatados e discutidos em diversas revisões de literatura (Benavente-Garcia & Castillo, 2008; Khan, Zill, & Dangles, 2014; Tripoli, La Guardia, Giammanco, Di Majo, & Giammanco, 2007). Considerando a importância destes compostos para a saúde humana, torna-se fundamental a análise de diversos tipos de alimentos para identificação das melhores fontes. Estudos quantitativos e qualitativos de compostos bioativos exigem cuidados na escolha do método de extração, pois nesta etapa deve-se assegurar que os compostos alvo não sejam perdidos, modificados ou destruídos durante a preparação do extrato que será posteriormente separado e caracterizado (Sasidharan, Chen, Saravanan, Sundram, & Yoga Latha, 2011).

Novos métodos de extração têm sido investigados, a maioria possui como apelos a melhor eficiência de extração, o menor tempo de extração e o menor consumo de solvente em relação às técnicas tradicionais (imersão, maceração e percolação). Dentre estes novos métodos estão a extração assistida por micro-

ondas, fluido supercrítico e solvente pressurizado (Chan, Yusoff, Ngoh, & Kung, 2011).

A extração assistida por micro-ondas (MAE) é uma técnica que apresenta um eficiente mecanismo de transferência de energia devido a dois mecanismos: a rotação dipolar e a condução iônica, nos quais os dipolos das moléculas e o íons, respectivamente, tentam se realinhar com o campo elétrico das micro-ondas. Como esse campo se alterna rapidamente, a movimentação das moléculas e dos íons resulta em um aquecimento rápido do meio, reduzindo o tempo de extração (Hayes, 2002; Routray & Orsat, 2012). Além disso, o mecanismo de aquecimento por MAE leva à expansão e consequente ruptura das paredes celulares, facilitando a remoção dos compostos de interesse de matrizes vegetais para o solvente, resultando em alto rendimento de extração (Ajila et al., 2011).

Considerando a importância do desenvolvimento de técnicas menos laboriosas e menos poluentes para extração de compostos bioativos, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para extração de compostos fenólicos de laranja assistida por micro-ondas que possa ser aplicado tanto a amostras congeladas como liofilizadas, considerando que estes são os métodos de conservação de amostras mais utilizados em laboratório e indústrias de alimentos.

2. Materiais e métodos

2.1. Padrões e reagentes

O padrão de hesperidina foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) e o de ácido elágico da Extrasynthèse (Lyon Nord, França). O padrão de hesperidina apresentou 98% de pureza e o de ácido elágico 99% de pureza, determinadas por HPLC-DAD. A acetonitrila de grau HPLC foi adquirida da J. T. Baker (Phillipsburg,

NJ) e o metanol de grau analítico, proveniente da Synth (São Paulo, Brasil). O reagente de Folin-Ciocalteu foi adquirido da Dinâmica (São Paulo, Brasil). A água ultrapura foi obtida por meio de sistema Milli-Q (Billerica, MA). As amostras e os padrões foram filtrados em membrana Millipore de 0,22 μm .

2.2. Materiais

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizadas laranjas [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera] provenientes do município de Monte Alto (São Paulo, Brasil). As amostras foram adquiridas (10 kg) na Central Estadual de Abastecimento S/A (CEASA) do município de Campinas (São Paulo, Brasil) em abril de 2013. Os frutos frescos apresentaram as seguintes características: umidade, $91,03 \pm 0,30$ g/100 g (n = 4); massa $154,15 \pm 6,32$ g (n = 15); diâmetro longitudinal $64,82 \pm 1,64$ mm (n = 15); diâmetro transversal $65,74 \pm 1,32$ mm (n = 15). As laranjas foram lavadas manualmente e com o auxílio de uma faca foram removidos o flavedo, o albedo, as membranas e as sementes. Apenas a polpa, composta pelas vesículas de suco, foi utilizada. A polpa foi homogeneizada manualmente e imediatamente congelada com nitrogênio líquido. Metade da quantidade de polpa congelada foi liofilizada (Liobras, São Paulo, Brasil), triturada em processador de alimentos doméstico e acondicionada a vácuo em sacos de polietileno. A outra metade foi apenas acondicionada a vácuo em sacos de polietileno. Ambas foram armazenadas em freezer a -36 °C até o momento das análises.

2.3. Extração sólido-líquido por agitação (SLE) de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram extraídos das amostras de laranja congelada (4,0 g) e liofilizada (0,4 g) em tubo de teflon com 20 mL de solução metanol/água [8:2(v/v)] por meio de agitação em *vortex* (Phoenix Luferco, AP56, São Paulo, Brasil) por 5 minutos à temperatura ambiente (22 ± 3 °C). Em seguida, o tubo foi centrifugado (Beckman Coulter, Allegra 64R, Palo Alto, CA) a 22000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e uma nova alíquota de solvente foi adicionada ao tubo para repetição do procedimento até extração exaustiva. Ao todo foram necessárias 5 extrações para a completa extração dos compostos fenólicos da amostra. A confirmação foi realizada qualitativamente utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, na qual o sobrenadante da sexta extração apresentou resultado negativo para a presença de compostos fenólicos. Ao final das extrações, os sobrenadantes foram combinados, formando um único extrato, o qual foi aferido em balão volumétrico com o mesmo solvente de extração.

2.4. Otimização da extração sólido-líquido assistida por micro-ondas (MAE) de compostos fenólicos

Para o desenvolvimento da metodologia MAE para compostos fenólicos realizou-se um planejamento experimental cujos parâmetros foram determinados a partir das condições da metodologia SLE e de testes preliminares.

2.4.1. Planejamento experimental

A otimização da extração de compostos fenólicos assistida por micro-ondas foi realizada inicialmente por meio de um delineamento composto de face centrada (DCFC) com 2 níveis e 3 fatores (Tabela 1); constituído por 8 ensaios fatoriais, 2

ensaios no ponto central e 6 ensaios axiais em face centrada, totalizando 16 ensaios. A variável dependente (resposta) foi o teor de compostos fenólicos totais determinado pelo método de Singleton and Rossi (1965).

Os seguintes parâmetros foram mantidos fixos: massa de amostra: 4 g para amostra congelada e 0,4 g para amostra liofilizada, tempo de extração: 10 minutos, tempo de resfriamento da amostra: 10 minutos e agitação: 200 rpm.

Tabela 1 - Variáveis independentes reais e codificadas e seus respectivos níveis.

Variáveis independentes		Níveis		
Real	Codificada	-1	0	+1
Temperatura (°C)	X ₁	40	50	60
Volume de solvente (mL)	X ₂	10	20	30
Razão metanol:água (MeOH:H ₂ O)	X ₃	7:3	8:2	9:1

2.4.2. Extração assistida por micro-ondas de compostos fenólicos

A MAE foi realizada em tubos de teflon para micro-ondas, com capacidade de 50 mL, utilizando sistema fechado de extração por micro-ondas (Milestone, Start-E, Sorisole, Itália). Os parâmetros de extração (temperatura, volume de solvente e razão metanol:água) foram determinados de acordo com o planejamento experimental. A programação de temperatura consistiu em atingir a temperatura desejada em 30 segundos utilizando a potência máxima de 400 W, manter a temperatura por 10 minutos, seguido de um período de resfriamento de 10 minutos. Após a extração, o conteúdo dos tubos foi centrifugado a 22000 g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e o volume aferido, com o mesmo solvente de extração, em balão volumétrico adequado, para determinação de compostos fenólicos totais e análise por HPLC.

2.5. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com o método de Singleton and Rossi (1965), adaptado para microplacas. A quantificação foi realizada a partir de uma curva analítica com ácido gálico nas concentrações de 12,5 a 150,0 mg/L. Os resultados foram expressos em mg de equivalente a ácido gálico (GAE) por 100 g de massa fresca (FW).

2.6. Determinação da composição de compostos fenólicos

A análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada em equipamento da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com bomba quaternária (LC-20AD), desgaseificador (DGU-20A5), válvula de injeção Rheodyne com *loop* de 20 µL e detectores de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M20A) e de espectrometria de massas (MS) (AmaZon speed ETD, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) com fonte de ionização *electrospray* (ESI) e analisador de massa/carga (*m/z ion trap*).

A separação dos compostos fenólicos foi realizada em coluna C₁₈ Synergi Hydro RP80A (4 µm, 250 x 4,6 mm i.d.) (Phenomenex, Torrance, CA), a uma vazão de 0,9 mL/min e temperatura da coluna de 29 °C, utilizando como fase móvel água (A) e acetonitrila (B), ambos contendo 0,5 % de ácido fórmico (v/v), em um gradiente linear (v/v) de A:B 90:10 para 70:30 em 30 min, depois para 50:50 em 2 min, mantendo esta proporção por 3 min, seguindo para 90:10 em 3 min e mantendo esta proporção por 12 min para re-equilíbrio da coluna. Para análise no MS, o fluxo proveniente do DAD foi dividido, permitindo a entrada de somente 0,15 mL/min na fonte ESI. O MS foi configurado com os seguintes

parâmetros: modo negativo; voltagem no capilar, 2 kV; voltagem na saída do capilar, -110 V; *skimmer* 1: 10 V, *skimmer* 2: 5 V; *end plate offset*, -500 V; temperatura do gás de secagem (N₂), 310 °C; vazão, 5 L/min; nebulizador, 30 psi. A energia de fragmentação para obtenção do MS/MS foi de 1,5 V (Chisté & Mercadante, 2012). Os espectros UV-visível foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas foram processados em 280 nm. A faixa de varredura para os espectros de massas foi de *m/z* 100 a 1000.

Os compostos fenólicos foram identificados a partir dos seguintes parâmetros: ordem e tempo de retenção em fase reversa, características dos espectros UV-visível e de massas comparados a padrões analisados nas mesmas condições e a informações da literatura (Barbosa, Peres, Gallori, & Vincieri, 2006; Caristi, Bellocco, Gargiulli, Toscano, & Leuzzi, 2006; Roowi & Crozier, 2011). Os compostos fenólicos foram quantificados a partir de uma curva analítica de 7 pontos de hesperidina (1 a 52 µg/mL). A curva mostrou-se linear ($r^2 = 0,99$) e com limites de detecção de 0,7 µg/mL e de quantificação de 1,6 µg/mL, calculados a partir dos parâmetros da curva analítica (desvio padrão e coeficiente angular) (ICH, 2005).

2.7. Validação do método de extração assistida por micro-ondas

A validação do método de extração de compostos fenólicos assistida por micro-ondas foi realizada através da quantificação tanto pelo método de Singleton and Rossi (1965) como por HPLC, por meio dos parâmetros de repetibilidade intra-dia e inter-dia e recuperação, sendo este último avaliado apenas por HPLC. A repetibilidade foi avaliada pelo desvio padrão relativo (% RSD). A recuperação foi feita por meio da adição de soluções do padrão de ácido elágico às amostras

de laranja (congelada e liofilizada) antes da extração. As soluções de ácido elágico foram preparadas em metanol em dois níveis de concentração, de modo que as concentrações finais do padrão de ácido elágico nos extratos era de 0,26 mg/g FW (nível 1) e de 0,52 mg/g FW (nível 2). Para comparação, os parâmetros de repetibilidade e recuperação também foram realizados para o método SLE.

2.8. Análise estatística dos resultados

A análise do planejamento experimental foi realizada utilizando o software Statistica versão 12. Os gráficos, as médias e desvio-padrão dos resultados das análises de compostos fenólicos totais e por HPLC foram calculados utilizando o software Origin versão 8. As médias dos resultados obtidos na otimização do método (razão amostra:solvente e cinética) foram comparadas através da análise de variância (ANOVA), complementada pelo Teste Tukey, quando detectadas diferenças significativas. Foi utilizado um intervalo de confiança de 95 %.

3. Resultados e discussão

3.1. Extração SLE

Não houve diferença entre os teores de compostos fenólicos totais ($P > 0,05$) obtidos por meio da SLE para as amostras congelada ($66,2 \pm 3,1$ mg GAE/100 g FW) e liofilizada ($68,7 \pm 3,3$ mg GAE/100 g FW). Estes resultados ratificam o fato de que a liofilização é uma técnica adequada para conservação de amostras por preservar as suas características (Ratti, 2001).

3.2. Planejamento experimental

Para execução do planejamento experimental, os experimentos foram divididos em dois blocos, sendo o primeiro constituído pelos ensaios fatoriais e pontos centrais. Como nenhum dos ensaios atingiu o teor de compostos fenólicos obtido pela extração SLE, foi realizado então, um segundo bloco de experimentos com os ensaios axiais em face centrada.

A análise do planejamento completo mostrou que as variáveis temperatura e volume de solvente foram significativas. Entretanto, não foi possível atingir o valor de compostos fenólicos obtido pela extração sólido-líquido por agitação na faixa estudada no planejamento (Tabela 2).

A análise de desejabilidade (Figura 1) indica que as condições em que se pode atingir o valor máximo de compostos fenólicos possível pelo planejamento são: temperatura a partir de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, volume de 30 mL e qualquer razão MeOH:H₂O. Desta forma, para esta última variável, optou-se pela relação 8:2, pois utiliza menos metanol que a 9:1 e permite a concentração do extrato mais facilmente do que a relação 7:3. Assim, a condição experimental correspondente ao ensaio 14

(50 °C, 30 mL e razão 8:2), foi escolhida para ser utilizada como partida para a otimização sequencial da extração.

Tabela 2 - Matriz do delineamento composto de face centrada e respectivas respostas experimentais.

Ensaio	Temperatura (°C)	Volume (mL)	MeOH:H ₂ O ^a	Fenólicos Totais ^b	
				Amostra congelada	Amostra liofilizada
1	40	20	7:3	42,9	50,6
2	60	20	7:3	48,2	51,1
3	40	30	7:3	53,8	61,2
4	60	30	7:3	60,5	62,3
5	40	20	9:1	50,9	47,0
6	60	20	9:1	51,7	50,7
7	40	30	9:1	55,9	58,5
8	60	30	9:1	58,4	59,7
9	50	25	8:2	54,1	55,1
10	50	25	8:2	51,6	55,3
11	40	25	8:2	52,1	54,2
12	60	25	8:2	52,9	54,1
13	50	20	8:2	54,8	55,1
14	50	30	8:2	64,5	63,5
15	50	25	7:3	54,6	54,7
16	50	25	9:1	55,0	55,5

^a Razão metanol:água

^b Resultados expressos em mg de equivalente a ácido gálico (GAE) por 100 g de peso fresco (FW).

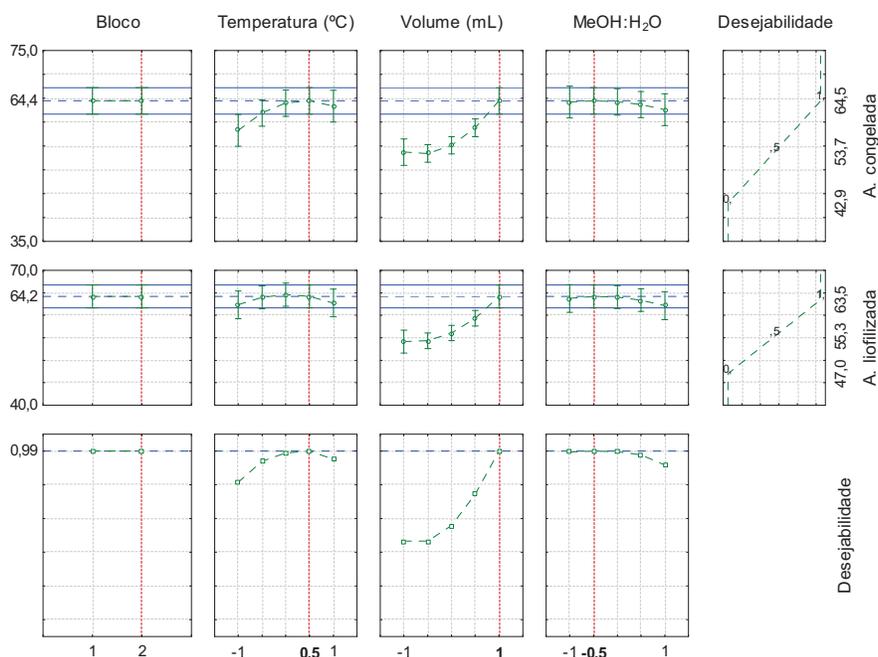


Figura 1. Análise pela função desejabilidade dos resultados obtidos no delineamento composto de face centrada para extração de compostos fenólicos.

3.3. Otimização sequencial

Para otimização, optou-se por avaliar somente a variável volume, uma vez que, de acordo com a desejabilidade, há uma tendência de aumento do teor de fenólicos extraídos com o aumento do volume de solvente. Entretanto, o maior nível utilizado no planejamento (30 mL) corresponde à capacidade máxima dos tubos utilizados para centrifugação dos extratos e equivale a uma razão amostra:solvente de 1:7,5 para amostra congelada e 1:75 para a amostra liofilizada. Assim, para que fosse possível avaliar o parâmetro volume, a massa de amostra foi reduzida pela metade (2 g para amostra congelada e 0,2 g para amostra liofilizada) e foram utilizados os mesmos níveis de volume de solvente do planejamento (20, 25 e 30 mL), desta forma a razão amostra:solvente torna-se

maior: 1:10; 1:12,5 e 1:15 para a amostra congelada e 1:100; 1:125 e 1:150 para a amostra congelada.

Para os dois tipos de amostra, o teor máximo de compostos fenólicos (equivalente à SLE) foi atingido a partir da razão 1:12,5 para a amostra congelada e 1:125 para a amostra liofilizada (Figura 2), o que corresponde ao volume de 25 mL. Cabe ressaltar que esta razão representa apenas metade da razão necessária para a extração sólido-líquido por agitação. A maior eficiência da MAE neste aspecto pode ser atribuída ao aquecimento da solução de extração, o que aumenta a difusividade do solvente na matriz e a dissolução dos compostos no solvente (Camel, 2000).

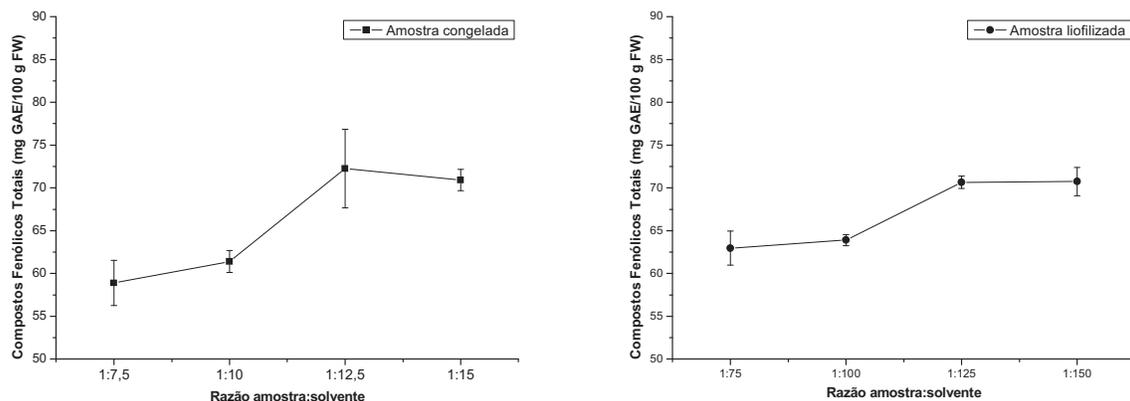


Figura 2. Teores de compostos fenólicos obtidos por diferentes razões amostra:solvente para as amostras congelada (esquerda) e liofilizada (direita).

Após a otimização do volume de solvente, o tempo de extração foi avaliado através de uma cinética (Figura 3), a fim de verificar a influência do tempo de exposição da amostra às micro-ondas e determinar o tempo mais adequado para realizar a extração. Não foram observadas diferenças significativas entre os

resultados obtidos na faixa de tempo avaliada (5 a 15 min), tanto para a amostra congelada quanto para amostra liofilizada. Entretanto, observou-se para a amostra congelada, uma tendência de aumento no teor de compostos fenólicos extraídos até o tempo de 10 min. Para a amostra liofilizada, a partir de 10 min foi observada a redução no desvio padrão dos resultados, o que corresponde a uma melhor repetibilidade da análise. Assim, o tempo de 10 min foi selecionado para validação do método.

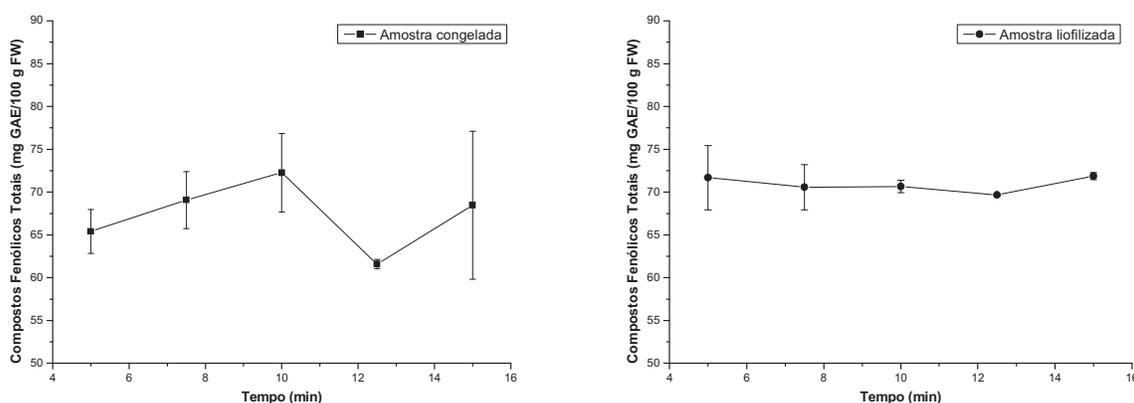


Figura 3. Cinética de extração de compostos fenólicos por MAE para as amostras congelada (esquerda) e liofilizada (direita).

O método MAE otimizado para compostos fenólicos de laranja consistiu nos seguintes parâmetros: massa de 2,0 g para amostra congelada e de 0,2 g para amostra liofilizada, razão MeOH:H₂O de 8:2, volume de solvente de 25 mL, rampa de 30 s para atingir a temperatura de 50 °C, mantida por 10 min, utilizando uma potência máxima de 400 W e agitação de 200 rpm, seguido por um período de resfriamento de 10 min.

3.4. Perfil de compostos fenólicos

A determinação de compostos fenólicos utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu é considerada uma análise pouco específica e representa, na verdade, a capacidade redutora do extrato (Huang, Ou, & Prior, 2005). Assim, foram realizadas análises por HPLC nos extratos obtidos pelos métodos MAE otimizado e SLE a fim de verificar possíveis alterações na composição do extrato provocadas pelas micro-ondas. Os extratos foram analisados por HPLC-DAD-MS/MS, e os cromatogramas encontram-se na Figura 4, onde é possível observar que a utilização das micro-ondas para extração não provocou alterações no perfil de compostos fenólicos do extrato em relação ao método SLE.

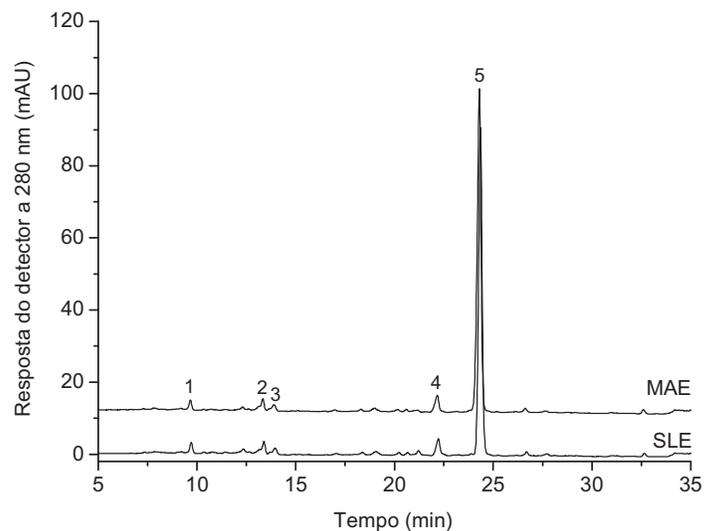


Figura 4. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para extratos obtidos pelos métodos MAE otimizado e SLE. Condições cromatográficas: ver texto. A identificação dos picos está apresentada na Tabela 3.

Foram separados 5 compostos na polpa de laranja Pera, cuja identificação está apresentada na Tabela 3. Os tempos de retenção e as características dos espectros UV-visível e de massas de 20 padrões de compostos fenólicos foram utilizados para confirmar a presença ou ausência destes compostos na amostra e auxiliar na identificação.

O pico 1, com absorção máxima em 293 e 320 nm, $[M-H]^-$ de m/z 385, e m/z 191 como fragmento mais abundante no MS/MS, não foi identificado. Este composto representou 1,8 % do total de compostos fenólicos encontrados na laranja Pera.

O pico 2 correspondeu a 1,6 % do total de compostos fenólicos e foi tentativamente identificado como apigenina-6,8-di-C-hexosídeo devido à molécula desprotonada de m/z 593 $[M-H]^-$ e fragmentos MS/MS de m/z 503 $[M-H-90]^-$, m/z 473 $[M-H-120]^-$ e m/z 353 $[M-H-120-120]^-$, que representam perdas relativas a porção glicosídica da molécula. Este tipo de fragmentação é característica de compostos C-glicosilados, que não tendem a perder a unidade de açúcar inteira, como ocorre com os compostos O-glicosilados (Cuyckens & Claeys, 2004). O mesmo composto foi previamente identificado em suco de várias espécies de *Citrus* do sul da Itália (Caristi et al., 2006).

Tabela 3 - Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos fenólicos de laranja, obtidas por HPLC-DAD-MSⁿ

Pico ^a	Composto	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (-) (m/z) ^d	MS ³ (m/z) ^e
1	Não identificado	9.7	293 (sh), 320	385	367 [M-H-18] ⁻ , 209 [M-H-176] ⁻ , 191 [M-H-194]⁻	173 , 147, 129
2	Apigenina-6,8-di-C-hexosídeo (Vicenina - 2) ^g	13.5	271, 335	593	503 [M-H-90] ⁻ , 473 [M-H-120] ⁻ , 383 [M-H-120-90] ⁻ , 353 [M-H-120-120]⁻	325, 297 , 191, 163, 117
3	Miricetina-3-O-rutinosídeo ^g	14.1	284	625	597, 317 [M-H-308]⁻ , 289	289 , 273, 257, 231, 179, 151, 125
4	Naringenina-7-O-rutinosídeo (Narirutina) ^g	22.4	283, 323	579	271 [M-H-308]⁻ , 177	177, 151 , 125, 107
5	Hesperitina-7-O-rutinosídeo (Hesperidina) ^f	24.5	284, 325	609	301 [M-H-308]⁻ , 285	285 , 257, 241, 215, 199, 173, 151, 125

^a Numeração de acordo com o cromatograma da Figura 4. ^b Tempo de retenção na coluna C₁₈. ^c Solvente: gradiente de água e acetonitrila, ambos contendo 0,5% de ácido fórmico. ^d O MS/MS foi realizado a partir do [M-H]⁻, e o íon mais abundante está em negrito. ^e O MS³ foi realizado no íon mais abundante do MS/MS. ^f Identificado (padrão disponível). ^g Tentativamente identificado.

O pico 3 representou 1,1 % do total de compostos fenólicos e apresentou $[M-H]^-$ de m/z 625 e um fragmento no MS/MS de m/z 317, que corresponde a aglicona miricetina após a perda de um grupo rutinose (308 u). Este composto foi tentativamente identificado como miricetina-3-O-rutinosídeo, baseado na semelhança das características do mesmo composto encontrado em *Chrysobalanus icaco* L (Barbosa et al., 2006). O fragmento de m/z 317 foi submetido ao MS³ e o seu padrão de fragmentação foi similar ao de um padrão autêntico de miricetina (Tabela 3).

O pico 4 foi tentativamente identificado como narirutina (naringenina-7-O-rutinosídeo), com $[M-H]^-$ de m/z 579 e um fragmento MS/MS de m/z 271 (naringenina), resultante da perda neutra de 308 u (rutinose). Esta flavanona já foi encontrada em *Citrus suhuiensis* e em *Citrus microcarpa* (Roowi & Crozier, 2011). O MS³ do fragmento de m/z 271 mostrou-se similar ao padrão de fragmentação de um padrão autêntico de naringenina. Este composto correspondeu a 5,2 % do total de compostos fenólicos encontrado e representa o segundo composto majoritário da amostra.

Por fim, o pico 5 foi identificado como hesperidina (hesperitina-7-O-rutinosídeo), sendo o composto majoritário presente na amostra, representando 90,3 % do total de compostos fenólicos. Este composto apresentou o mesmo tempo de retenção, características dos espectros UV e de massas, incluindo o mesmo padrão de fragmentação, de um padrão autêntico de hesperidina. Este pico apresentou $[M-H]^-$ de m/z 609 e um fragmento MS/MS de m/z 301, que corresponde a hesperetina após a perda do grupo rutinose (308 u).

3.5. Validação do método

Considerando-se o mesmo método de extração (SLE ou MAE) e comparando os resultados determinados pelo método de Folin-Ciocalteu para os dois tipos de amostra (congelada e liofilizada), não houve diferença significativa nos teores de compostos fenólicos (Tabela 4). No entanto, comparando os resultados obtidos pelas duas análises para a amostra congelada, o teor de compostos fenólicos obtido por MAE foi ligeiramente maior (aproximadamente 7 %) que o obtido por SLE.

Tabela 4 - Teor de compostos fenólicos totais quantificado por Folin-Ciocalteu nos extratos de laranja obtidos através de MAE e SLE.

Método de extração	n	Amostra congelada	Amostra liofilizada
SLE	6	66,2 ± 3,1 ^{aA}	68,7 ± 3,3 ^{aA}
MAE	6	70,8 ± 2,5 ^{bB}	72,0 ± 2,3 ^{bA}

SLE: Extração sólido-líquido por agitação; MAE: extração sólido-líquido assistida por micro-ondas. Resultados expressos como média ± desvio-padrão, em mg GAE/100 g FW. Médias com a mesma letra minúscula sobrescrita na mesma linha, ou a mesma letra maiúscula sobrescrita na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($P > 0,05$).

A hesperidina foi o composto majoritário encontrado na polpa de laranja Pera analisada, sendo o único composto quantificado (Tabela 5), pois os demais estavam abaixo do limite de quantificação (1,6 µg/mL). Em relação aos resultados obtidos por HPLC, não houve diferenças significativas entre as amostras quando extraídas pelo mesmo método, nem entre os dois métodos para o mesmo tipo de amostra. A pequena diferença encontrada no método de Singleton and Rossi (1965) pode ser decorrente da baixa especificidade do reagente de Folin-Ciocalteu, que pode ser reduzido não somente pelos compostos fenólicos, como

também por açúcares, ácido ascórbico e outros compostos com capacidade redutora presentes no extrato (Huang et al., 2005).

Nossos resultados demonstram uma grande vantagem da utilização da MAE em relação a outros métodos de extração, que é a possibilidade de exaustão da amostra com uma única extração. Tal fato está associado à capacidade das micro-ondas em aumentar a pressão intracelular e causar a ruptura da célula liberando os analitos no meio, o que, associado à temperatura elevada do solvente de extração, facilita a dissolução dos compostos (Eskilsson & Björklund, 2000).

O rendimento mais elevado na extração de compostos fenólicos por MAE, em relação aos métodos convencionais, tem sido relatado em diversos trabalhos na literatura com diferentes matrizes, como cerejas ácidas (Garofulic, Dragovic-Uzelac, Jambrak, & Jukic, 2013), resíduos fermentados de cervejaria (Moreira, Morais, Barros, Delerue-Matos, & Guido, 2012) e grãos de café verde (Upadhyay, Ramalakshmi, & Rao, 2012). Entretanto, nestes estudos, os métodos tidos como convencionais, a extração foi realizada uma única vez na amostra, não sendo avaliado se a extração de compostos fenólicos da amostra foi exaustiva.

Tabela 5 - Teor de hesperidina obtido por HPLC de extratos de laranja obtidos através de MAE e SLE.

Método de extração	n	Amostra congelada	Amostra liofilizada
SLE	6	61,7 ± 5,4 ^{aA}	65,0 ± 2,0 ^{aB}
MAE	6	63,3 ± 3,2 ^{bA}	63,7 ± 1,2 ^{bB}

SLE: Extração sólido-líquido por agitação; MAE: extração sólido-líquido assistida por micro-ondas. Resultados expressos como média ± desvio-padrão, em mg de hesperidina/100 g FW. Médias com a mesma letra minúscula sobrescrita na mesma linha, ou a mesma letra maiúscula sobrescrita na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($P > 0,05$).

O método MAE otimizado no presente estudo apresentou uma excelente repetibilidade (Tabela 6), com um RSD menor que 4 % para o método espectrofotométrico e cerca de 5 % para o método cromatográfico, mostrando-se mais reprodutível que o método SLE, o qual apresentou RSD acima de 4,5 % e 8,5 %, para os métodos espectrofotométrico e cromatográfico, respectivamente. Outros trabalhos utilizando MAE para compostos fenólicos em diferentes tipos de matrizes também relataram boa repetibilidade do método (RSD entre 0,19 % e 6,9 %) (Proestos & Komaltis, 2008; Tan et al., 2011; Zhu, Wang, Liu, Xia, & Tang, 2010), o que demonstra a boa precisão da MAE para compostos fenólicos.

Tabela 6 - Parâmetros de validação dos métodos MAE e SLE para compostos fenólicos.

Parâmetros ^a	n	Amostra congelada		Amostra liofilizada	
		MAE	SLE	MAE	SLE
Folin-Ciocalteu					
Repetibilidade intra-dia	3	2,7	1,2	1,5	0,6
Repetibilidade inter-dia	6	3,6	4,6	3,2	4,7
HPLC					
Repetibilidade intra-dia	3	3,3	5,3	2,6	0,4
Repetibilidade inter-dia	6	5,0	8,7	1,9	3,1
Recuperação - nível 1 ^b	3	92,4 ± 2,5	99,5 ± 2,6	93,9 ± 0,8	102,9 ± 1,2
Recuperação - nível 2 ^c	3	93,5 ± 1,3	95,4 ± 4,2	96,8 ± 2,5	99,4 ± 2,4

^a Resultados expressos em desvio padrão relativo (% RSD). ^b 0,26 mg de ácido elágico/g FW. ^c 0,52 mg de ácido elágico/g FW.

A recuperação da MAE também pode ser considerada boa (92,4 % a 96,8 %), apesar de menor que a da SLE (95,4 % a 102,9 %). Proestos and Komaltis (2008) avaliaram a recuperação de diversos padrões por MAE, e obtiveram resultados variando entre 86 e 104%. Liazid, Palma, Brigui, and Barroso (2007)

avaliaram a estabilidade de padrões submetidos à MAE e obtiveram valores de recuperação variando de 96 a 108 %.

4. Conclusão

O método MAE desenvolvido no presente estudo mostrou ser reprodutível e apresentou boa recuperação, além disso, quando comparado com o método SLE convencional, consome 75 % menos solvente, utiliza metade da massa de amostra e é 2,5 vezes mais rápido se for considerada a extração de uma única amostra. Como o equipamento de micro-ondas utilizado neste trabalho permite a extração de até 12 amostras simultaneamente, a MAE é 30 vezes mais rápido para este número de amostras.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Referências

- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valero, J. R. (2011). Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 227-249. doi: 10.3109/07388551.2010.513677
- Barbosa, W. L. R., Peres, A., Gallori, S., & Vincieri, F. F. (2006). Determination of myricetin derivatives in *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 333-337.

- Benavente-Garcia, O., & Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem*, *56*(15), 6185-6205. doi: 10.1021/jf8006568
- Camel, V. (2000). Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, *19*(4), 229-248. doi: 10.1016/S0165-9936(99)00185-5
- Caristi, C., Bellocco, E., Gargiulli, C., Toscano, G., & Leuzzi, U. (2006). Flavone-di-C-glycosides in citrus juices from southern Italy. *Food Chemistry*, *95*(3), 431-437. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.01.031
- Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G. C., & Kung, F. W. L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, *1218*(37), 6213-6225. doi: 10.1016/j.chroma.2011.07.040
- Chisté, R. C., & Mercadante, A. Z. (2012). Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(23), 5884-5892. doi: 10.1021/Jf301904f
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, *26*(8), 1001-1043. doi: 10.1039/B802662a
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, *39*(1), 1-15. doi: 10.1002/Jms.585
- Eskilsson, C. S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, *902*(1), 227-250.
- FAO. (2014). FAOSTAT. Retrieved jan/2014, from Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E>

- Garofulic, I. E., Dragovic-Uzelac, V., Jambrak, A. R., & Jukic, M. (2013). The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117(4), 437-442. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.12.043
- Hayes, B. L. (2002). *Microwave synthesis: chemistry at the speed of light*. Metthews: CEM Publishing.
- Huang, D. J., Ou, B. X., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856. doi: 10.1021/Jf030723c
- ICH. (2005). *ICH Harmonised Tripartite Guideline - Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- Khan, M. K., Zill, E. H., & Dangles, O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 85-104. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.004>
- Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., & Barroso, C. G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1140(1-2), 29-34. doi: 10.1016/j.chroma.2006.11.040
- Moreira, M. M., Morais, S., Barros, A. A., Delerue-Matos, C., & Guido, L. F. (2012). A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(4), 1019-1029. doi: 10.1007/s00216-011-5703-y
- Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2006). Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data

- from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S66-S73. doi: 10.1016/j.jfca.2005.12.006
- Proestos, C., & Komaltis, M. (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *Lwt-Food Science and Technology*, 41(4), 652-659. doi: 10.1016/j.lwt.2007.04.013
- Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*, 49(4), 311-319. doi: 10.1016/S0260-8774(00)00228-4
- Roowi, S., & Crozier, A. (2011). Flavonoids in Tropical Citrus Species. *J Agric Food Chem*, 59(22), 12217-12225. doi: 10.1021/Jf203022f
- Routray, W., & Orsat, V. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 409-424. doi: 10.1007/s11947-011-0573-z
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 8(1), 1-10.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Tan, S. N., Yong, J. W. H., Teo, C. C., Ge, L. Y., Chan, Y. W., & Hew, C. S. (2011). Determination of metabolites in *Uncaria sinensis* by HPLC and GC-MS after green solvent microwave-assisted extraction. *Talanta*, 83(3), 891-898. doi: 10.1016/j.talanta.2010.10.048
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., & Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), 466-479. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.11.054

- Upadhyay, R., Ramalakshmi, K., & Rao, L. J. M. (2012). Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. *Food Chemistry*, 130(1), 184-188. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.06.057
- Zhu, H. B., Wang, Y. Z., Liu, Y. X., Xia, Y. L., & Tang, T. (2010). Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food Analytical Methods*, 3(2), 90-97. doi: 10.1007/s12161-009-9091-2

CAPÍTULO IV

Desenvolvimento de um método rápido para extração de carotenoides de manga

Ádria de Sousa Bentes, Adriana Zerlotti Mercadante

Artigo em preparação para ser submetido à revista *Talanta*

Desenvolvimento de um método rápido para extração de carotenoides de manga

Ádria de Sousa Bentes, Adriana Zerlotti Mercadante

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil

RESUMO

Manga cv. Haden (*Mangifera indica* L.) liofilizada foi utilizada para avaliar três formas de extração de carotenoides: extração assistida por micro-ondas (MAE), agitação magnética e extração tradicional por maceração. Também foi avaliada a eficiência de extração dos solventes, acetona e da mistura acetato de etila:metanol (1:1 v/v). Os teores de carotenoides totais obtidos com acetato de etila:metanol (266,21 a 269,66 µg/g de amostra liofilizada) foram superiores aos obtidos com acetona (230,45 a 243,43 µg/g de amostra liofilizada) em todos os métodos avaliados. 14 carotenoides foram identificados, por HPLC-DAD-MS², na manga Haden. O *all-trans*-β-caroteno, a *all-trans*-violaxantina e a *9-cis*-violaxantina foram os compostos majoritários e juntos corresponderam a 82% dos carotenoides totais. Através da comparação com a extração por agitação magnética e por maceração, as micro-ondas não exerceram influência na extração, e também não provocaram alterações no perfil de carotenoides da amostra, mesmo quando foram utilizadas temperaturas mais elevadas (50 a 64 °C). Assim, optou-se por validar o método utilizando apenas agitação magnética (20 mL de acetato de etila:metanol, 200 rpm por 5 min a temperatura ambiente). Este novo método de extração de carotenoides apresentou elevada precisão (RSD < 3%) e exatidão

(recuperação entre 101,01 e 109,43 %). O novo método foi quase 20 vezes mais rápido, consumiu 80 % menos amostra e 67 % menos solvente, que a extração por maceração. Além disso, o método de extração de carotenoides por agitação magnética é simples, em termo de equipamento necessário, e pode ser amplamente empregado em diversos laboratórios.

PALAVRAS-CHAVE: Carotenoides, manga Haden, extração assistida por micro-ondas, extração sólido-líquido, validação.

1. Introdução

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis que apresentam um amplo sistema de ligações duplas conjugadas, responsável pelas propriedades de absorção de luz e também pela suscetibilidade a degradação por diversos fatores, como temperaturas elevadas, baixo pH, luz e espécies reativas de oxigênio [1].

Altas temperaturas podem provocar a reação de isomerização da forma *trans* para a *cis*, formação de produtos de oxidação (epóxidos e apo-carotenal), rearranjo epoxi-furanoide e degradação a compostos voláteis, sendo os três últimos, reações irreversíveis [2]. A isomerização é a principal reação que ocorre durante o aquecimento a temperaturas inferiores a 100 °C, sendo o isômero 13-*cis*-carotenoide formado preferencialmente em relação ao isômero 9-*cis*-carotenoide [1]. Por isso, a escolha do método de extração deve ser criteriosa e levar em consideração a alta labilidade dos carotenoides.

Diversos métodos têm sido empregados para extração de carotenoides em amostras vegetais. Extrações líquido-líquido [3, 4] e sólido-líquido utilizando maceração em almofariz [5] e agitação por vortex [6] são as técnicas mais comuns. Novas tecnologias de extração também tem sido empregadas na extração de carotenoides com o objetivo de reduzir o consumo de solventes e o tempo de extração. Dentre as novas técnicas destacam-se o fluido supercrítico [7, 8], o ultrassom [9] e as micro-ondas [10].

A extração assistida por micro-ondas (MAE) tem se destacado como uma metodologia que apresenta alto rendimento de extração, pois seu mecanismo de aquecimento causa aumento da pressão intracelular e conseqüente ruptura da célula com extravazamento do seu conteúdo para o solvente. O solvente, por estar em temperatura elevada, apresenta maior capacidade de dissolução dos

compostos, aumentando o rendimento da extração [11]. A utilização de MAE para carotenoides tem sido pouco explorada, provavelmente devido à labilidade térmica destes compostos.

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é uma planta proveniente do sul da Ásia (Índia e arquipélago Malaio) [12], cujos frutos apresentam um alto teor de carotenoides, que pode variar de 12,5 a 55,0 µg/g de polpa dependendo da cultivar, estágio de maturação e origem geográfica [13]. Apesar destas variações, as diversas cultivares de manga apresentam uma composição majoritária comum, constituída pelos compostos, *all-trans*-violaxantina, *9-cis*-violaxantina e *all-trans*-β-caroteno [13-15].

O perfil de carotenoides da manga é adequado para avaliação do efeito das micro-ondas sobre esta classe de compostos, pois a presença majoritária da *all-trans*-violaxantina, que é um epóxi-carotenoide, permite a verificação de alterações na amostra, como isomerização e rearranjo epoxi-furanoide, que podem ocorrer em decorrência da utilização das micro-ondas [16]. Este rearranjo poderia ser observado através da redução nos teores do epóxido *all-trans*-violaxantina e aumento do seu furanoide correspondente, a *all-trans*-luteoxantina.

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar um método rápido para extração de carotenoides de manga cv.Haden (*Mangifera indica* L.), que mantenha a composição original da amostra.

2. Materiais e métodos

2.1. Padrões e reagentes

O padrão de *all-trans*-β-caroteno foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) e os padrões de *9-cis*-neoxantina, *all-trans*-violaxantina e *all-trans*-

anteraxantina, da CaroteNature (Lupsingen, Suíça). Os padrões de all-*trans*-luteína, all-*trans*-zeaxantina e all-*trans*- β -criptoxantina foram doados pela DSM Nutritional Products (Basel, Suíça). Todos os padrões apresentaram no mínimo 93% de pureza, a qual foi determinada por HPLC-DAD. O metanol e o éter metil *terc*-butílico (MTBE), ambos de grau HPLC, foram adquiridos da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ). Metanol, acetato de etila, acetona, éter etílico, éter de petróleo e hidróxido de potássio de grau analítico foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). As amostras e padrões foram filtrados em membrana Millipore de 0,22 μ m.

2.2. Materiais

As amostras de manga cv. Haden (*Mangifera indica* L.) (7 kg) foram adquiridas na Central Estadual de Abastecimento S/A (CEASA) do município de Campinas (São Paulo, Brasil) em outubro de 2013. Os frutos eram provenientes do município de Juazeiro (Bahia, Brasil). Os frutos frescos apresentaram as seguintes características: umidade, $79,16 \pm 0,52$ g/100 g ($n = 4$); massa $495,46 \pm 31,19$ g ($n = 13$); diâmetro longitudinal $116,18 \pm 4,06$ mm ($n = 13$) e diâmetro transversal $87,52 \pm 2,28$ mm ($n = 13$). Os frutos foram lavados manualmente e foram removidas as cascas e a semente com o auxílio de uma faca. A polpa foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido, liofilizada (Liobras, São Paulo, Brasil), triturada em processador de alimentos doméstico e acondicionada a vácuo em sacos de polietileno. A amostra foi armazenada em freezer a -36 °C até o momento das análises.

2.3. Extração

Foram realizados ensaios para determinação do solvente mais adequado para extração dos carotenoides. Foram avaliados os solventes acetona e a mistura acetato de etila (EtOAc):metanol (MeOH) (1:1 v/v) tanto na extração sólido-líquido por maceração (SLE) como na MAE.

2.3.1. Extração sólido-líquido por maceração

A extração sólido-líquido por maceração (SLE) dos carotenoides foi realizada em almofariz com pistilo de acordo com De Rosso and Mercadante [17], utilizando Hyflo Supercel para aumentar a superfície de contato da amostra com o solvente. Foram utilizados 1,0 g de amostra liofilizada e 10 mL de solvente, em seguida, a amostra foi filtrada a vácuo, recolhida novamente para o almofariz e adicionada de uma nova alíquota de solvente. O processo de extração foi repetido ao todo 6 vezes. A exaustão da amostra foi verificada pela ausência de cor no extrato da 7^a extração, para os dois solventes avaliados. Ao final, os extratos foram combinados e submetidos à partição do extrato em éter etílico/éter de petróleo (EE/EP, 1:1 v/v) e lavagem com água destilada (apenas quando o solvente utilizado foi acetona), uma vez que a presença de acetona na etapa de hidrólise alcalina pode provocar a formação de artefatos por condensação aldólica em carotenoides contendo as funções aldeído e cetona [18]. Após a etapa de partição, o extrato foi adicionado de um volume igual de solução de 10 % de hidróxido de potássio em metanol (m/v) e permaneceu em mesa agitadora à frequência de 20 Hz por 16 horas para hidrólise alcalina dos ésteres de xantofilas. Após esta etapa, o extrato foi submetido a uma nova etapa de partição idêntica à descrita anteriormente, porém desta vez para remoção do álcali; e em seguida, foi

seco em evaporador rotativo. Os extratos secos foram armazenados no escuro, sob atmosfera de nitrogênio, em freezer a -36 °C até o momento das análises.

2.3.2. Extração sólido-líquido assistida por micro-ondas

A extração assistida por micro-ondas (MAE) dos carotenoides foi realizada em sistema extrator por micro-ondas (Milestone, Start-E, Sorisole, Itália), utilizando tubos de teflon.

Inicialmente, para avaliação do solvente mais adequado para extração foram fixados os seguintes parâmetros para MAE: a massa de amostra em 0,2 g; o volume de solvente em 30 mL; a temperatura em 40 °C, e a agitação em 200 rpm. A programação de temperatura consistiu em atingir a temperatura desejada em 30 s utilizando a potência máxima de 200 W nos ensaios de avaliação dos solventes, e de 450 W nos ensaios do planejamento (devido à utilização de temperaturas maiores). Após atingir a temperatura adequada, a mesma foi mantida por 5 minutos, e em seguida os tubos foram resfriados em banho de gelo. Após a extração, o conteúdo dos tubos foi submetido à filtração a vácuo, partição em EE/EP, hidrólise alcalina e concentração em evaporador rotativo, conforme descrito no item 2.3.1. Os extratos secos foram armazenados no escuro, sob atmosfera de nitrogênio, em freezer a -36 °C até o momento das análises.

O planejamento experimental para extração de carotenoides assistida por micro-ondas foi realizado por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR) com 2 níveis e 2 fatores (Tabela 1); constituído por 4 ensaios fatoriais, 4 ensaios no ponto central e 4 ensaios axiais, totalizando 12 ensaios (Tabela 2).

Tabela 1

Variáveis independentes reais e codificadas e seus respectivos níveis.

Variáveis independentes		Níveis				
Real	Codificada	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura (°C)	X ₁	36	40	50	60	64
Volume de solvente (mL)	X ₂	16	20	30	40	44

Foram determinadas como variáveis independentes a temperatura e o volume de solvente. A temperatura foi escolhida para se avaliar até que ponto o aumento deste fator (dentro da faixa selecionada) seria favorável à extração, sem causar alterações na composição de carotenoides da amostra. A escolha do volume de solvente está relacionada à avaliação da quantidade de solvente necessária para extração e solubilização dos compostos. As respostas avaliadas foram as concentrações de *all-trans*-violaxantina, *9-cis*-violaxantina, *all-trans*-luteoxantina e carotenoides totais, determinadas por HPLC-DAD.

2.3.3. Extração sólido-líquido por agitação magnética

Foi realizada a extração por agitação magnética como controle da extração assistida por micro-ondas, para avaliação da relevância das micro-ondas na extração dos carotenoides. Para isso, foi realizada a extração de forma semelhante à MAE, no próprio equipamento de micro-ondas, mas sem aplicação das micro-ondas. Foram mantidos fixos, a massa de amostra em 0,2 g, a agitação em 200 rpm e o tempo de extração de 5 min. A extração foi realizada a temperatura ambiente (23 ± 3 °C) e o volume de solvente foi determinado a partir dos resultados do planejamento experimental.

2.4. Análise de carotenoides por HPLC-DAD-MS²

Os carotenoides foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em um equipamento da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com bomba quaternária (LC-20AD), desgaseificador (DGU-20A5), válvula de injeção Rheodyne, com *loop* de 20 μ L, acoplado aos detectores de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M20A) e espectrômetro de massas (MS) (Amazon speed ETD, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), com fonte de ionização APCI e analisador de massa/carga (m/z) *ion trap*.

A separação dos carotenoides foi realizada em coluna C₃₀ YMC (5 μ m, 250 x 4,6 mm i.d.) (Waters, Wilmington, NC), através de um gradiente linear (v/v) de metanol (A) e MTBE (B) de 95:05 para 70:30 em 30 min, depois para 50:50 em 20 min, mantendo esta proporção por 10 min, utilizando vazão de 0,9 mL/min e temperatura da coluna de 29 °C [17]. Os espectros UV-visível foram adquiridos de 200 a 600 nm e processado em 450 nm. O MS foi configurado da seguinte maneira: modo positivo; descarga corona, 4000 nA; temperatura da fonte, 450 °C; temperatura do gás de secagem (N₂), 350 °C e vazão de 5 L/min; nebulizador, 5 psi; energia de fragmentação, 1,4 V. Os espectros de massas foram obtidos na faixa de m/z de 100 a 700.

A identificação dos carotenoides foi realizada baseada nos seguintes parâmetros: ordem de eluição em coluna C₃₀, características dos espectros UV-visível [$\lambda_{\text{máx}}$, estrutura fina do espectro (% III/II) e intensidade do pico *cis* (% A_B/A_{II})] e de massas, comparando com padrões analisados nas mesmas condições e com informações presentes na literatura [5, 17, 19]. Os carotenoides foram quantificados a partir de curvas analíticas externas de 7 pontos de 9-*cis*-neoxantina (0,9-17,1 μ g/mL), all-*trans*-violaxantina (0,7-13,6 μ g/mL), all-*trans*-

anteraxantina (0,8-15,9 µg/mL), all-*trans*-luteína (1,0-59,5 µg/mL), all-*trans*-zeaxantina (1,3-59,7 µg/mL), e all-*trans*-β-caroteno (1,1-30,2 µg/mL). Os teores dos demais carotenoides foram estimados a partir da curva analítica da all-*trans*-luteína e do all-*trans*-β-caroteno, e os isômeros *cis* foram estimados utilizando a curva dos seus respectivos isômeros all-*trans*. Todas as curvas mostraram-se lineares ($r^2 = 0,99$). Os limites de detecção e de quantificação foram calculados a partir dos parâmetros da curva analítica (desvio padrão e coeficiente angular) [20, 21] e foram os seguintes: 9-*cis*-neoxantina (0,06 e 0,18 µg/mL), all-*trans*-violaxantina (0,12 e 0,36 µg/mL), all-*trans*-anteraxantina (0,05 e 0,15 µg/mL), all-*trans*-luteína (0,17 e 0,52 µg/mL), all-*trans*-zeaxantina (0,05 e 0,14 µg/mL), e all-*trans*-β-caroteno (0,11 e 0,35 µg/mL).

2.5. Validação do método

A validação do método otimizado para extração de carotenoides foi realizada pela avaliação dos seguintes parâmetros: repetibilidade intra-dia e inter-dia e recuperação. A repetibilidade foi avaliada pelo desvio padrão relativo (% RSD). A recuperação foi realizada por meio da adição de soluções do padrão de all-*trans*-luteína à amostra de manga antes da extração. Foi escolhida uma xantofila para realizar a validação, pois estes carotenoides são mais suscetíveis a perdas e degradação ao longo da extração, permitindo assim, uma avaliação mais robusta do método.

As soluções de luteína foram preparadas em metanol em dois níveis de concentração, de modo que as concentrações finais do padrão de luteína nos extratos era de 30 µg/g de amostra liofilizada (nível 1) e 60 µg/g de amostra liofilizada (nível 2).

2.6. Análise estatística dos resultados

A análise do planejamento experimental foi realizada utilizando o software Statística versão 12. Os gráficos, as médias e o desvio padrão dos resultados das análises de carotenoides por HPLC foram calculados utilizando o software Origin versão 8. A comparação das médias foi realizada através da análise de variância (ANOVA), utilizando um intervalo de confiança de 95 %.

3. Resultados e discussão

3.1. Composição de carotenoides

Foram separados, por HPLC, 14 carotenoides na polpa de manga Haden (Figura 1), que foram identificados, ou tentativamente identificados, com base na combinação das informações obtidas por meio da ordem de eluição na coluna C₃₀, características dos espectros UV-visível, e dos espectros de massas (Tabela 2). Os fragmentos MS/MS específicos gerados a partir da fragmentação cadeia poliênica e de grupos funcionais permitiu a confirmação da identidade da molécula protonada. Tendo em vista que a descrição detalhada da identificação de carotenoides utilizando as informações citadas acima já foi descrita na literatura [5, 17, 19], apenas alguns dos parâmetros mais relevantes foram discutidos abaixo.

A identificação dos seguintes compostos: 9-*cis*-neoxantina (pico 1), all-*trans*-violaxantina (pico 2), all-*trans*-luteína (pico 6), all-*trans*-zeaxantina (pico 7), e all-*trans*-β-caroteno (pico 13), foi confirmada por apresentarem os mesmos tempos de retenção de padrões autênticos, além das mesmas características de espectros UV e de massas e padrões de fragmentação.

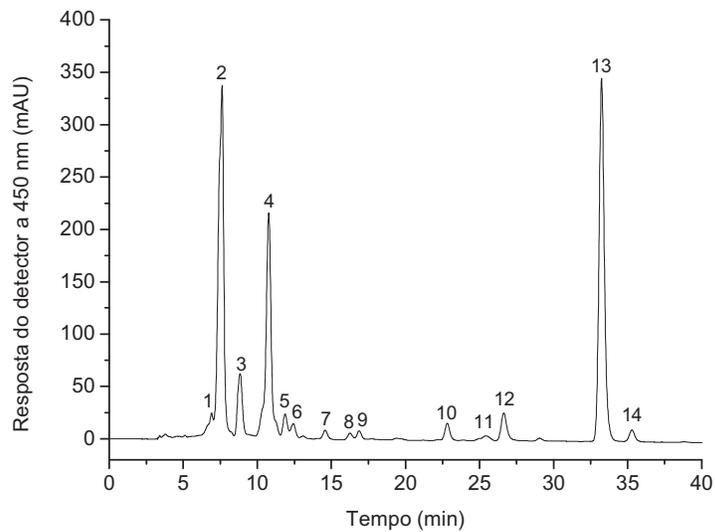


Figura 1. Cromatograma obtido por HPLC-DAD dos carotenoides de manga. Condições cromatográficas: ver texto. A identificação dos picos está apresentada na Tabela 2.

Os isômeros *cis* de carotenoides apresentam, em relação à forma *all-trans*, um pequeno deslocamento hipsocrômico (aproximadamente 4 nm) na banda principal de absorção (II), além de um aumento no "pico *cis*" à medida que a ligação dupla *cis* se aproxima do centro da molécula [22]. Considerando estas características, o pico 5 foi tentativamente identificado como 9-*cis*-luteoxantina devido à ordem de eluição em relação ao seu isômero *all-trans* (pico 3) e deslocamento hipsocrômico de 4 nm na banda II, e um pico *cis* com uma relação % A_B/A_{II} pequena no espectro UV-visível.

Tabela 2

Características cromatográficas e espectroscópicas dos carotenoides de manga Haden.

Pico ^a	Carotenoide	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	% III/II	% A _B /A _{II}	[M+H] ⁺ (m/z) ^d	MS/MS (m/z)
1	9- <i>cis</i> -neoxantina ^e	6,9	327, 417, 439, 468	67	15	601	583 [M+H-18]⁺ , 565 [M+H-18-18] ⁺ , 509 [M+H-92] ⁺ , 491[M+H-18-92] ⁺ , 221
2	all- <i>trans</i> -violaxantina ^e	7,6	327, 415, 438, 468	94	0	601	583 [M+H-18]⁺ , 565 [M+H-18-18] ⁺ , 509 [M+H-92] ⁺ , 491 [M+H-18-92] ⁺ , 221
3	all- <i>trans</i> -luteoxantina ^e	8,8	398, 421, 448	92	0	601	583 [M+H-18]⁺ , 565 [M+H-18-18] ⁺ , 509 [M+H-92] ⁺ , 491[M+H-18-92] ⁺ , 221
4	9- <i>cis</i> -violaxantina ^f	10,8	326, 411, 434, 463	95	8	601	583 [M+H-18]⁺ , 565 [M+H-18-18] ⁺ , 509 [M+H-92] ⁺ , 491[M+H-18-92] ⁺ , 221
5	9- <i>cis</i> -luteoxantina ^f	11,9	310, 395, 417, 443	87	8	601	583 [M+H-18]⁺ , 565 [M+H-18-18] ⁺ , 509 [M+H-92] ⁺ , 491[M+H-18-92] ⁺ , 221
6	all- <i>trans</i> -luteína ^e	12,5	423, 444, 471	43	0	569	551 [M+H-18]⁺ , 533 [M+H-18-18] ⁺ , 477 [M+H-92] ⁺
7	all- <i>trans</i> -zeaxantina ^e	14,6	429, 450, 476	33	0	569	551 [M+H-18]⁺ , 533 [M+H-18-18] ⁺ , 477 [M+H-92] ⁺
8	9- <i>cis</i> -antheraxantina ^f	16,3	328, 418, 440, 467	50	18	585	567 [M+H-18]⁺ , 549 [M+H-18-18] ⁺ , 493 [M+H-92] ⁺ , 221
9	5,6-epoxi-β-criptoxantina ^f	16,9	425, 445, 472	60	0	569	551 [M+H-18]⁺ , 533 [M+H-18-18] ⁺ , 477 [M+H-92] ⁺ , 221
10	all- <i>trans</i> -β-criptoxantina ^e	22,9	426, 448, 475	33	0	553	535 [M+H-18]⁺ , 461 [M+H-92] ⁺
11	15- <i>cis</i> -β-caroteno ^f	25,5	334, 423, 447, 470	n.c. ^g	52	537	444 [M-92] ⁺ , 413 [M+H-124]⁺ , 399 [M-137] ⁺ , 347
12	13- <i>cis</i> -β-caroteno ^f	26,8	340, 424, 442, 468	12	50	537	444 [M-92] ⁺ , 413 [M+H-124]⁺ , 399 [M-137] ⁺ , 347
13	all- <i>trans</i> -β-caroteno ^e	33,4	427, 451, 478	33	0	537	444 [M-92] ⁺ , 413 [M+H-124]⁺ , 399 [M-137] ⁺ , 347
14	9- <i>cis</i> -β-caroteno ^f	35,5	423, 447, 472	20	n.c.	537	444 [M-92] ⁺ , 413 [M+H-124]⁺ , 399 [M-137] ⁺ , 347

^a Numeração de acordo com o cromatograma da Figura 1. ^b Tempo de retenção na coluna C₃₀. ^c Gradiente linear de metanol/MTBE. ^d O MS/MS foi realizado a partir do [M+H]⁺, e o íon mais abundante está em negrito. ^e Identificado (padrão disponível). ^f Tentativamente identificado. ^g n.c. = não calculado.

O pico 8 foi tentativamente identificado como 9-*cis*-antheraxantina, pois este composto apresentou eluição posterior ao padrão autêntico do seu isômero *all-trans* e também deslocamento hipsocrômico de 4 nm na banda II, em relação ao mesmo padrão, o que está de acordo com o encontrado em outro trabalho do nosso grupo com a espécie *Caryocar villosum* [21]. Além disso, uma relação % $A_{\text{B}}/A_{\text{II}}$ pequena é característica dos isômeros 9-*cis*.

A manga Haden apresentou como carotenoides majoritários o *all-trans*- β -caroteno, a *all-trans*-violaxantina e a 9-*cis*-violaxantina, que juntos correspondem a 82 % do total de carotenoides presentes na amostra, o que está de acordo com trabalhos prévios publicados sobre a composição de carotenoides de diferentes cultivares de manga [13-15].

3.2. Escolha do solvente de extração

De acordo com os resultados dos ensaios de avaliação dos solventes (Tabela 3), não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) nos teores de carotenoides totais obtidos por MAE e SLE, quando foi utilizado o mesmo solvente.

Teores maiores ($P < 0,05$) de carotenoides totais foram observados nos extratos obtidos com EtOAc:MeOH (1:1 v/v) em relação aos obtidos com acetona, em ambos os métodos de extração. Este resultado é devido aos maiores níveis de xantofilas obtidos com a utilização de EtOAc:MeOH. Em relação aos carotenos, os resultados não diferiram, exceto quando foi utilizado EtOAc:MeOH na SLE, cujo teor de *all-trans*- β -caroteno foi maior que nos demais extratos.

Tabela 3

Teores de carotenoides obtidos por SLE e MAE utilizando acetona e acetato de etila:metanol (1:1) como solventes de extração.

Pico	Carotenoide	SLE - acetona	SLE - EtOAc:MeOH	MAE - acetona	MAE - EtOAc:MeOH
1	9- <i>cis</i> -neoxantina ¹	6,78 ± 0,47 ^a	11,30 ± 1,40 ^b	7,50 ± 1,25 ^a	10,73 ± 0,86 ^b
2	<i>all-trans</i> -violaxantina ²	69,01 ± 1,08 ^a	82,71 ± 1,01 ^b	75,37 ± 5,86 ^{ab}	82,01 ± 2,83 ^b
3	<i>all-trans</i> -luteoxantina ³	6,60 ± 0,45 ^a	8,51 ± 0,61 ^a	6,33 ± 0,39 ^a	11,92 ± 0,47 ^b
4	9- <i>cis</i> -violaxantina ²	45,01 ± 0,57 ^a	53,22 ± 0,82 ^b	48,20 ± 3,40 ^{ab}	52,22 ± 1,70 ^b
5	9- <i>cis</i> -luteoxantina ³	2,37 ± 0,07 ^a	2,71 ± 0,19 ^a	2,66 ± 0,16 ^a	4,35 ± 0,09 ^b
6	<i>all-trans</i> -luteína ³	2,30 ± 0,05 ^a	2,78 ± 0,02 ^b	2,61 ± 0,03 ^c	2,97 ± 0,15 ^d
7	<i>all-trans</i> -zeaxantina ⁴	1,78 ± 0,06 ^a	2,09 ± 0,04 ^b	2,10 ± 0,04 ^{bc}	2,23 ± 0,07 ^c
8	9- <i>cis</i> -anteraxantina ⁵	1,01 ± 0,02 ^a	1,47 ± 0,05 ^b	1,37 ± 0,04 ^c	1,46 ± 0,04 ^{bc}
9	5,6-epoxi-β-criptoxantina ⁶	1,00 ± 0,04 ^{ab}	1,34 ± 0,03 ^a	0,59 ± 0,07 ^{bc}	0,52 ± 0,13 ^c
10	<i>all-trans</i> -β-criptoxantina ⁶	2,57 ± 0,07 ^a	3,05 ± 0,07 ^b	2,45 ± 0,04 ^a	2,26 ± 0,06 ^a
11	15- <i>cis</i> -β-caroteno ⁶	0,81 ± 0,08 ^a	0,92 ± 0,01 ^a	0,64 ± 0,07 ^a	0,64 ± 0,09 ^a
12	13- <i>cis</i> -β-caroteno ⁶	6,29 ± 0,09 ^a	6,73 ± 0,09 ^a	6,42 ± 0,42 ^a	6,43 ± 0,09 ^a
13	<i>all-trans</i> -β-caroteno ⁶	82,55 ± 1,04 ^a	90,33 ± 0,45 ^b	84,61 ± 1,95 ^a	86,19 ± 0,88 ^a
14	9- <i>cis</i> -β-caroteno ⁶	2,37 ± 0,12 ^{ab}	2,49 ± 0,05 ^{ab}	2,59 ± 0,08 ^a	2,27 ± 0,08 ^b
Carotenoides totais		230,45 ± 1,38 ^a	269,66 ± 2,43 ^b	243,43 ± 10,93 ^a	266,21 ± 7,00 ^b

Os picos foram quantificados (n=3) como equivalentes a 9-*cis*-neoxantina¹, *all-trans*-violaxantina², *all-trans*-luteína³, *all-trans*-zeaxantina⁴, *all-trans*-anteraxantina⁵, e *all-trans*-β-caroteno⁶. Valores expressos em µg/g de amostra liofilizada.

Médias com a mesma letra minúscula sobrescrita na mesma linha não apresentam diferença significativa entre si ($P > 0,05$).

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os teores de isômeros *cis* obtidos pelos dois métodos, utilizando o mesmo solvente de extração, exceto pela concentração de 9-*cis*-luteoxantina, que foi maior ($P < 0,05$) na extração por MAE utilizando EtOAc:MeOH. Além disso, o extrato obtido por MAE com EtOAc:MeOH também apresentou um teor maior de all-*trans*-luteoxantina, mas sem redução nos teores de all-*trans*-violaxantina, o que dificulta a afirmação de que houve rearranjo epoxi-furanoide.

3.3. Avaliação da extração de carotenoides assistida por micro-ondas

Diversos trabalhos na literatura têm relatado a maior eficiência de extração de várias classes de compostos (capsaicinoides, compostos fenólicos e antocianinas) em diferentes tipos de matrizes vegetais por MAE [23-25]. Tendo em vista os trabalhos da literatura e que os resultados obtidos por MAE nos ensaios de avaliação de solventes não diferiram dos obtidos por SLE, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para verificar a possibilidade de extração de maiores teores de carotenoides por MAE, utilizando EtOAc:MeOH como solvente, por ter apresentado os melhores resultados.

Os resultados do planejamento encontram-se na Tabela 4. O perfil de carotenoides manteve-se similar ao longo dos ensaios do planejamento, mesmo quando foram utilizadas temperaturas mais elevadas (50 a 64 °C). Não foram detectados novos picos no cromatograma e não houve alteração nas proporções entre os carotenoides. Portanto, nas condições avaliadas, a MAE não provocou isomerização, rearranjo ou degradação na estrutura dos carotenoides de manga. A Tabela suplementar S1 apresenta os teores em cada ensaio dos 14 carotenoides identificados na manga.

Tabela 4

Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) e respectivas respostas experimentais.

Ensaio	Variáveis independentes		Respostas			
	X ₁	X ₂	all- <i>trans</i> -violaxantina	9- <i>cis</i> -violaxantina	all- <i>trans</i> -luteoxantina	Carotenoides totais
1	40	20	85,80	54,89	10,83	278,43
2	60	20	88,37	56,09	9,78	282,56
3	40	40	83,03	54,09	13,37	277,37
4	60	40	85,83	55,88	12,97	285,22
5	50	30	79,79	52,41	14,63	271,05
6	50	30	85,34	54,60	10,35	276,03
7	50	30	89,01	57,53	9,45	284,09
8	50	30	87,45	55,62	9,75	280,63
9	36	30	87,22	55,71	10,97	282,41
10	64	30	87,40	56,03	9,46	280,02
11	50	16	83,61	53,71	13,20	277,49
12	50	44	85,29	54,42	9,82	273,60

X₁: Temperatura (°C); X₂: Volume (mL). Valores expressos em µg/g de amostra liofilizada.

Diversos estudos utilizando MAE em matrizes contendo carotenoides têm relatado perdas e isomerização destes compostos [16, 26, 27]. No entanto, estes trabalhos apresentam como característica comum o controle apenas da potência e não da temperatura. Este é um fator de extrema relevância, pois a fixação apenas da potência pode resultar em temperaturas muito elevadas, o que para compostos considerados termolábeis pode ser extremamente prejudicial.

Outros trabalhos, visando a otimização da extração de carotenoides por MAE, não avaliaram a formação de isômeros pela extração [28-30]. O presente

estudo foi o primeiro a aplicar MAE com controle de temperatura para extrair carotenoides e analisar os extratos por HPLC-DAD-MS² a fim de verificar alterações na composição da amostra.

A análise do DCCR mostrou que na faixa estudada, nenhuma das variáveis avaliadas foi significativa a um intervalo de confiança de 95 % ($P > 0,05$). Pasquet, Cherouvrier, Farhat, Thiery, Piot, Berard, Kaas, Serive, Patrice, Cadoret and Picot [31] avaliaram a aplicação da MAE para carotenoides de microalgas e também observaram que as micro-ondas não tiveram influência na extração de carotenoides em microalgas que não possuíam frústula, uma parede celular dura constituída basicamente de sílica encontrada nas diatomáceas.

3.4. Extração por agitação magnética

Para a realização da extração por agitação magnética, optou-se por um volume de solvente reduzido (20 mL), uma vez que esta variável não foi significativa no DCCR. Os demais parâmetros foram executados de acordo com o item 2.3.3.

Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os teores de carotenoides obtidos por MAE (ponto central) e por agitação magnética (Tabela 5), por isso pode-se afirmar que as micro-ondas não influenciaram a extração dos carotenoides de manga.

Tabela 5

Teores de carotenoides obtidos por MAE e agitação magnética utilizando acetato de etila:metanol (1:1 v/v).

Pico	Carotenoide	MAE*	Agitação magnética**
1	9- <i>cis</i> -neoxantina ¹	11,50 ± 0,51 ^a	11,41 ± 0,30 ^a
2	<i>all-trans</i> -violaxantina ²	85,40 ± 4,03 ^a	84,55 ± 1,87 ^a
3	<i>all-trans</i> -luteoxantina ³	11,05 ± 2,42 ^a	12,14 ± 1,61 ^a
4	9- <i>cis</i> -violaxantina ²	55,04 ± 2,13 ^a	53,07 ± 1,78 ^a
5	9- <i>cis</i> -luteoxantina ³	3,50 ± 0,51 ^a	4,30 ± 0,75 ^a
6	<i>all-trans</i> -luteína ³	3,06 ± 0,09 ^a	2,98 ± 0,04 ^a
7	<i>all-trans</i> -zeaxantina ⁴	2,15 ± 0,04 ^a	2,13 ± 0,03 ^a
8	9- <i>cis</i> -anteraxantina ⁵	1,28 ± 0,07 ^a	1,24 ± 0,02 ^a
9	5,6-epoxi-β-criptoxantina ⁶	0,72 ± 0,04 ^a	0,61 ± 0,08 ^a
10	<i>all-trans</i> -β-criptoxantina ⁶	2,89 ± 0,04 ^a	2,81 ± 0,04 ^b
11	15- <i>cis</i> -β-caroteno ⁶	0,78 ± 0,05 ^a	0,75 ± 0,02 ^a
12	13- <i>cis</i> -β-caroteno ⁶	6,70 ± 0,18 ^a	6,51 ± 0,15 ^a
13	<i>all-trans</i> -β-caroteno ⁶	91,51 ± 1,99 ^a	90,70 ± 0,33 ^a
14	9- <i>cis</i> -β-caroteno ⁶	2,38 ± 0,06 ^a	2,42 ± 0,11 ^a
Carotenoides totais		277,95 ± 5,66 ^a	275,63 ± 1,84 ^a

Os picos foram quantificados como equivalentes a 9-*cis*-neoxantina¹, *all-trans*-violaxantina², *all-trans*-luteína³, *all-trans*-zeaxantina⁴, *all-trans*-anteraxantina⁵, e *all-trans*-β-caroteno⁶. Valores expressos em µg/g amostra liofilizada.

* Valores obtidos pelo ponto central do planejamento (n = 4). Condições de extração: massa de amostra: 0,2 g, 50 °C, 30 mL, agitação: 200 rpm, potência máxima de 450 W, tempo: 5 min.

** Condições de extração (n = 3): massa de amostra: 0,2 g, 20 mL, agitação: 200 rpm, tempo: 5 min.

Médias com a mesma letra minúscula sobrescrita na mesma linha não apresentam diferença significativa entre si (P > 0,05).

3.4. Validação do método

O método desenvolvido para extração de carotenoides por agitação magnética consistiu nos seguintes parâmetros: massa de amostra, 0,2 g, solvente acetato de etila:metanol (1:1 v/v), volume de solvente de 20 mL e agitação de 200 rpm por 5 minutos.

A validação foi realizada por meio da adição do padrão de luteína à amostra de manga liofilizada antes da extração. Os resultados da repetibilidade (Tabela 6) mostraram que o método de extração por agitação magnética possui excelente precisão, apresentando erro médio relativo menor que 3%. O método também mostrou boa exatidão, com os valores de recuperação variando, em média, entre 101,01 e 109,43 %. Desta forma, pode-se afirmar que o método desenvolvido é seguro e eficiente para extração de carotenoides, não havendo perdas por lixiviação, isomerização ou degradação dos carotenoides presentes.

Tabela 6 - Parâmetros de validação do método extração de carotenoides por agitação magnética.

Parâmetros ^a	<i>all-trans</i> -luteína
Repetibilidade intra-dia (n = 3)	2,83
Repetibilidade inter-dia (n = 6)	2,89
Recuperação - nível 1 ^b (n = 3)	109,43 ± 3,09
Recuperação - nível 2 ^c (n = 3)	101,01 ± 2,89

^a Resultados expressos em %. ^b 30 µg/g amostra liofilizada. ^c 60 µg/g amostra liofilizada.

4. Conclusão

A extração assistida por micro-ondas (MAE) não provocou alterações na composição de carotenoides de manga, não sendo observadas perdas nem isomerização, mesmo quando foram utilizadas temperaturas elevadas (50 a 64

°C). Além disso, a MAE não apresentou influência nos teores de carotenoides extraídos de manga.

O método de extração de carotenoides por agitação magnética desenvolvido no presente trabalho mostrou-se preciso e exato. Além disso, o novo método é quase 20 vezes mais rápido, consome 80 % menos amostra, 67 % menos solvente, 50 % menos água destilada (o que representa em torno de 6 litros por amostra), quando comparado à extração convencional (SLE utilizando acetona).

Agradecimentos

As autoras agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] A.Z. Mercadante, Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage, in: C. Socaciu (Ed.) Food colorants: chemical and functional properties, CRC Press, Boca Raton, 2008, pp. 213-240.
- [2] C.D. Borsarelli, A.Z. Mercadante, Thermal and photochemical degradation of carotenoids, in: J.T. Landrum (Ed.) Carotenoids : physical, chemical, and biological functions and properties, CRC Press, Boca Raton, 2010, pp. 229-253.
- [3] A.J. Melendez-Martinez, G. Britton, I.M. Vicario, F.J. Heredia, Food Chemistry, 109 (2008) 546-553.
- [4] P. Dugo, M. Herrero, D. Giuffrida, C. Ragonese, G. Dugo, L. Mondello, J Sep Sci, 31 (2008) 2151-2160.

- [5] E. Rodrigues, L.R.B. Mariutti, A.Z. Mercadante, *J Agr Food Chem*, 61 (2013) 3022-3029.
- [6] A.A.O. Xavier, A.Z. Mercadante, L.D. Domingos, W.H. Viotto, *Quim Nova*, 35 (2012) 2057-2062.
- [7] G.L. Filho, V. De Rosso, M.A.A. Meireles, P.T.V. Rosa, A.L. Oliveira, A.Z. Mercadante, F.A. Cabral, *J Supercrit Fluid*, 46 (2008) 33-39.
- [8] S. Machmudah, Zakaria, S. Winardi, M. Sasaki, M. Goto, N. Kusumoto, K. Hayakawa, *J Food Eng*, 108 (2012) 290-296.
- [9] L.F. Zhang, Z.L. Liu, *Ultrason Sonochem*, 15 (2008) 731-737.
- [10] K. Sinha, S. Chowdhury, P. Das Saha, S. Datta, *Ind Crop Prod*, 41 (2013) 165-171.
- [11] C.H. Chan, R. Yusoff, G.C. Ngoh, F.W.L. Kung, *J Chromatogr A*, 1218 (2011) 6213-6225.
- [12] C.A.d.Q. Pinto, D.J. Silva, P.A.d.C. Pinto, Mangueira, in: L.A. Crisóstomo, A. Naumov (Eds.) *Aduando para alta produtividade e qualidade: fruteiras tropicais do Brasil*, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, 2009, pp. 125-145.
- [13] A.Z. Mercadante, D.B. Rodriguez-Amaya, *J Agr Food Chem*, 46 (1998) 128-130.
- [14] J.D. Ornelas-Paz, E.M. Yahia, A. Gardea-Bejar, *J Agr Food Chem*, 55 (2007) 6628-6635.
- [15] I. Pott, D.E. Breithaupt, R. Carle, *Phytochemistry*, 64 (2003) 825-829.
- [16] B.H. Chen, Y.Y. Chen, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (1993) 1315-1320.
- [17] V.V. De Rosso, A.Z. Mercadante, *J Agr Food Chem*, 55 (2007) 5062-5072.

- [18] A.J. Melendez-Martinez, I.M. Vicario, F.J. Heredia, *J Food Compos Anal*, 20 (2007) 638-649.
- [19] R.B. van Breemen, L.L. Dong, N.D. Pajkovic, *Int J Mass Spectrom*, 312 (2012) 163-172.
- [20] ICH, ICH Harmonised Tripartite Guideline - Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
- [21] R.C. Chisté, A.Z. Mercadante, *J Agr Food Chem*, 60 (2012) 5884-5892.
- [22] S. Liaaen-Jensen, *E/Z Isomers and Isomerization*, in: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (Eds.) *Carotenoids volume 4: natural functions*, Birkhäuser Verlag, Basel, 2008, pp. 15-36.
- [23] G.F. Barbero, M. Palma, C.G. Barroso, *Anal Chim Acta*, 578 (2006) 227-233.
- [24] A. Liazid, R.F. Guerrero, E. Cantos, M. Palma, C.G. Barroso, *Food Chem*, 124 (2011) 1238-1243.
- [25] H.Y. Li, Z.Y. Deng, T. Wu, R.H. Liu, S. Loewen, R. Tsao, *Food Chem*, 130 (2012) 928-936.
- [26] C. Nimalaratne, D. Lopes-Lutz, A. Schieber, J.P. Wu, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2012) 12547-12552.
- [27] T.C. Kha, M.H. Nguyen, P.D. Roach, C.E. Stathopoulos, *Journal of Food Engineering*, 117 (2013) 486-491.
- [28] L. Zhao, G. Zhao, F. Chen, Z. Wang, J. Wu, X. Hu, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006) 8346-8351.
- [29] B. Hiranvarachat, S. Devahastin, *Journal of Food Engineering*, 126 (2014) 17-26.

[30] B. Hiranvarachat, S. Devahastin, N. Chiewchan, G.S.V. Raghavan, *Journal of Food Engineering*, 115 (2013) 190-197.

[31] V. Pasquet, J.R. Cherouvrier, F. Farhat, V. Thiery, J.M. Piot, J.B. Berard, R. Kaas, B. Serive, T. Patrice, J.P. Cadoret, L. Picot, *Process Biochem*, 46 (2011) 59-67.

Tabela suplementar S1

Teores de carotenoides obtidos nos ensaios do delineamento composto central rotacional.

Pico	Carotenoide	Ensaio											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	9- <i>cis</i> -neoxantina ¹	11,88	11,43	11,61	12,20	11,37	11,98	10,84	11,81	12,04	10,47	12,02	11,74
2	all- <i>trans</i> -violaxantina ²	85,80	88,37	83,03	85,83	79,79	85,34	89,01	87,45	87,22	87,40	83,61	85,29
3	all- <i>trans</i> -luteoxantina ³	10,83	9,78	13,37	12,97	14,63	10,35	9,45	9,75	10,97	9,46	13,20	9,82
4	9- <i>cis</i> -violaxantina ²	54,89	56,09	54,09	55,88	52,41	54,60	57,53	55,62	55,71	56,03	53,71	54,42
5	9- <i>cis</i> -luteoxantina ³	3,49	3,30	4,09	3,91	4,27	3,23	3,22	3,29	3,53	3,23	4,13	3,27
6	all- <i>trans</i> -luteína ³	3,15	2,99	2,94	3,16	2,96	3,08	3,18	3,01	3,00	2,94	2,92	2,85
7	all- <i>trans</i> -zeaxantina ⁴	2,15	2,19	2,12	2,20	2,12	2,13	2,20	2,13	2,17	2,23	2,17	2,15
8	9- <i>cis</i> -anteraxantina ⁵	1,36	1,28	1,25	1,38	1,22	1,27	1,37	1,24	1,24	1,30	1,27	1,25
9	5,6-epoxi- β -criptoxantina ⁶	0,78	0,80	0,65	0,81	0,56	0,71	0,89	0,74	0,69	0,77	0,62	0,70
10	all- <i>trans</i> - β -criptoxantina ⁶	2,78	3,04	2,95	3,02	2,86	2,88	2,95	2,88	3,07	2,95	2,87	2,90
11	15- <i>cis</i> - β -caroteno ⁶	0,81	0,72	0,84	0,89	0,71	0,81	0,76	0,83	0,71	0,66	0,84	0,67
12	13- <i>cis</i> - β -caroteno ⁶	6,57	6,49	6,72	7,10	6,49	6,92	6,67	6,74	6,63	6,55	6,88	6,16
13	all- <i>trans</i> - β -caroteno ⁶	91,31	93,53	91,16	93,45	89,33	90,38	93,55	92,78	92,94	93,62	90,69	90,09
14	9- <i>cis</i> - β -caroteno ⁶	2,62	2,54	2,54	2,42	2,32	2,37	2,46	2,36	2,48	2,42	2,57	2,29
Carotenoides totais		278,43	282,56	277,37	285,22	271,05	276,03	284,09	280,63	282,41	280,02	277,49	273,60

Os picos foram quantificados como equivalentes a 9-*cis*-neoxantina¹, all-*trans*-violaxantina², all-*trans*-luteína³, all-*trans*-zeaxantina⁴, all-*trans*-anteraxantina⁵, e all-*trans*- β -caroteno⁶. Valores expressos em $\mu\text{g/g}$ amostra liofilizada.

CONCLUSÃO GERAL

No estudo com jenipapo foi possível classificar com sucesso os frutos de acordo com o grau de maturação através dos parâmetros de força máxima de penetração e de cor. Também foi possível relacionar os perfis de iridoídeos e de ácidos clorogênicos com o estágio de maturação e a porção do fruto (mesocarpo e endocarpo). O geniposídeo foi o iridoídeo majoritário no jenipapo verde e a genipina-gentiobiosídeo no jenipapo maduro. Além disso, foi observada ausência de ácidos clorogênicos no estágio maduro. O jenipapo verde pode ser utilizado como fonte de geniposídeo para posterior obtenção de pigmento azul, que pode ser utilizado pela indústria de corantes naturais. A ausência de reação de formação de pigmento azul no jenipapo maduro está provavelmente relacionada à baixa concentração de geniposídeo no fruto neste estágio de maturação.

O método de extração assistida por micro-ondas (MAE) desenvolvido para compostos fenólicos de laranja mostrou ser preciso, exato, rápido e econômico em relação ao consumo de solvente, representando uma excelente alternativa ao método de extração por agitação em vortex. A MAE nas condições otimizadas (2,0 gramas de amostra congelada ou 0,2 g de amostra liofilizada, razão MeOH:H₂O de 8:2, volume de solvente de 25 mL, rampa de 30 s para atingir 50 °C, mantida por 10 minutos, utilizando uma potência máxima de 400 W e agitação de 200 rpm, seguido por um período de resfriamento de 10 minutos) não alterou o perfil de compostos fenólicos de laranja.

Em relação à utilização das micro-ondas para extração de carotenoides de manga, não foi observada diferença em relação à extração controle (sem micro-ondas) para extração desta classe de compostos nas condições testadas. Ao

mesmo tempo, as micro-ondas não provocaram perdas nem isomerização dos carotenoides, mesmo quando foram utilizadas temperaturas elevadas.

A metodologia desenvolvida e validada para extração de carotenoides por agitação magnética mostrou-se precisa, exata e pouco laboriosa (0,2 g de amostra, 20 mL de acetato de etila:metanol, 200 rpm por 5 min a temperatura ambiente). Além disso, o novo método é ecologicamente mais adequado que a extração por maceração em almofariz pela redução do consumo de solventes orgânicos e de água.