



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



COMPOSTOS BIOATIVOS EM AMORA-PRETA E ENCAPSULAÇÃO DO SEU EXTRATO ANTOCIÂNICO POR GELIFICAÇÃO TÉRMICA COM CURDLANA

Daniela Souza Ferreira

Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. **Adriana Zerlotti Mercadante**

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

F413c Ferreira, Daniela Souza
Compostos bioativos em amora-preta e encapsulação do seu extrato antociânico por gelificação térmica com curdlana / Daniela Souza
Ferreira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Adriana Zerlotti Mercadante
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Antocianinas. 2. Compostos bioativos. 3. Amora-preta. 4.
Encapsulação. I. Mercadante, Adriana Zerlotti. II. Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Bioactive compounds in balckberry (*Rubus* spp.) and encapsulation of
blackberry anthocyanins using thermal gelification of curdlan

Palavras-chave em inglês (Keywords): Anthocyanins, Bioactive compounds, Balckberry,
Encapsulation

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Adriana Zerlotti Mercadante

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Veridiana Vera de Rosso

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
DCA / FEA / UNICAMP
(orientadora)

Profa. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
DEPAN / FEA / UNICAMP
(membro titular)

Profa. Dra. Veridiana Vera de Rosso
UNIFESP
(membro titular)

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio e Irany por serem o exemplo constante em minha vida de dedicação, trabalho, incentivo e amor incondicional e ao meu irmão Eduardo e sua esposa Ana Flávia.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente diariamente em minha vida me dando forças para que eu concluísse esta obra.

À minha orientadora, Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante, pela paciência, atenção e dedicação dada a mim e a este trabalho.

À banca examinadora, composta pelos professores Carlos Grosso e Veridiana de Rosso pelo auxílio e atenção, dados ao meu trabalho e a mim.

A todos do Laboratório de Química de Alimentos: Rosemar, Karla, Michele, Lílian, Gislaine, Leila, pela amizade, pela ajuda na parte prática e por tornarem o ambiente de trabalho agradável e familiar.

Às minhas amigas Gisela e Adélia pela colaboração e por me ajudarem quando eu mais precisava.

À Profa. Dra. Florinda Orsatti Bobbio pelos valiosos ensinamentos e pelos momentos de descontração em sua residência.

À Profa. Dra. Neura Bragagnolo pela orientação e confiança durante o estágio docente.

A todos que de certa forma participaram do meu esforço e me apoiaram para a conclusão deste trabalho.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMO GERAL	xv
SUMMARY.....	xvii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS.....	6

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Amora-preta	8
2. Compostos fenólicos em frutas vermelhas.....	9
2.1. Flavonóides	10
2.1.1. Antocianinas	10
2.2. Ácidos fenólicos.....	15
3. Carotenóides	17
4. Microencapsulação	20
4.1. Encapsulação de antocianinas	21
4.2. Gelificação iônica e térmica.....	22
4.2.1. Polissacarídeos como materiais de parede	23
4.2.1.1. Curdlana.....	24
4.2.1.2. Alginato	25
4.2.1.3. Pectina	26
5. Referências Bibliográficas	27

CAPÍTULO II

COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES EM AMORA-PRETA

RESUMO.....	36
1. INTRODUÇÃO	37

2. MATERIAL E MÉTODO	38
2.1. Amostra	38
2.2. Materiais	38
2.3. Equipamentos.....	39
2.4. Extração de compostos fenólicos	39
2.4.1. Determinação de compostos fenólicos totais.....	40
2.4.2. Determinação de flavonóides totais	40
2.5. Análise de antocianinas.....	41
2.5.1. Antocianinas totais.....	41
2.5.2. Antocianinas monoméricas	41
2.5.3. Antocianinas poliméricas	42
2.5.4. HPLC-PDA-MS/MS	43
2.6. Análise de carotenóides	44
2.6.1. Extração.....	44
2.6.2. Carotenóides totais	45
2.6.3. HPLC-PDA-MS/MS	45
2.7. Determinação da atividade anti-radical livre	46
2.7.1. Método DPPH	46
2.7.2. Método ABTS.....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1. Compostos bioativos de amora-preta.....	48
3.2. Atividade anti-radical livre de extratos de amora-preta.....	56
4. CONCLUSÕES	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

CAPÍTULO III

ENCAPSULATION OF BLACKBERRY ANTHOCYANINS USING THERMAL GELIFICATION OF CURDLAN

ABSTRACT	66
INTRODUCTION.....	67
MATERIAL AND METHODS.....	69

Materials	69
Preparation of the anthocyanin extract	69
Production of curdlan particles containing blackberry anthocyanic extract	70
Analysis of anthocyanins by HPLC-PDA-MS/MS	70
Characterization of particles	71
Determination of the release curves	72
RESULTS AND DISCUSSION	73
Particle preparation.....	73
Effect of the gelification process on the anthocyanin profile	74
Characterization of curdlan-anthocyanin particles	76
Release curves	79
REFERENCES	82
 CONCLUSÃO GERAL.....	 87

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Composição de carotenóides em frutas vermelhas.....	19
---	----

CAPÍTULO II

COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES EM AMORA-PRETA (*Rubus spp.*)

Tabela 1. Teores de compostos bioativos encontrados em amora-preta.	48
Tabela 2. Características cromatográficas, espectro UV-visível e espectrometria de massas de antocianinas de amora-preta obtidas por HPLC-PDA-MS/MS	52
Tabela 3. Características cromatográficas, dos espectros UV-visível e de massas de carotenóides de amora-preta obtidas por HPLC-PDA-MS/MS.....	55
Tabela 4. Valores de TEAC encontrados em diferentes frações de amora-preta.....	57

CAPÍTULO III

ENCAPSULATION OF BLACKBERRY ANTHOCYANINS USING THERMAL GELIFICATION OF CURDLAN

Table 1. Conditions used for thermal gelification of curdlan	74
Table 2. Chromatographic, UV - Vis and mass spectrometry characteristics of anthocyanins from blackberry, and percentage before and after encapsulation), obtained by HPLC-PDA-MS/MS	75
Table 3. Characteristics of curdlan-anthocyanins particles.....	78
Table 4. First order exponential parameters from release curves of anthocyanin particles obtained with different curdlan concentrations.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estruturas de flavanol e ácidos fenólicos	10
Figura 2. Estrutura do cátion flavilium	11
Figura 3. Equilíbrio das estruturas antociânicas em solução.....	12
Figura 4. Cromatogramas de HPLC em fase reversa e perfil de antocianinas identificadas em amora-preta (<i>Rubus laciniatus</i> Willd)	14
Figura 5. Estrutura da cianidina 3-glucosídeo	15
Figura 6. Estruturas do β -caroteno (a), α -caroteno (b) e β -criptoxantina (c)	17
Figura 7. Estrutura da curdlana.....	24

CAPÍTULO II

COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES EM AMORA-PRETA (*Rubus* spp.)

Figura 1: Distribuição de antocianinas em amora-preta	50
Figura 2. Cromatograma (processado a 520 nm), obtido por HPLC-PDA-MS/MS, do extrato antociânico de amora-preta	51
Figura 3. Cromatograma (processado a 450 nm) obtido por HPLC-PDA-MS/MS, de carotenóides de amora-preta.....	53
Figura 4. Curva de reação de diferentes concentrações de extrato de amora com DPPH em metanol.....	57

CAPÍTULO III

ENCAPSULATION OF BLACKBERRY ANTHOCYANINS USING THERMAL GELIFICATION OF CURDLAN

Figure 1. Chemical structures of blackberry anthocyanins	67
Figure 2. Anthocyanin profiles (A) before and (B) after the encapsulation process	75
Figure 3. Stereo - microscope images obtained from curdlan-anthocyanin particles made with (a) 4.3 % (objective 3.2x), (b) 5.1 % (objective 1.6x) and (c) 5.6 % (objective 2.0x) of curdlan	77

Figure 4. Size distribution of curdlan-anthocyanin particles made with (A) 4.3 % (w/v), (B) 5.1 % (w/v) and (C) 5.6 % (w/v) of curdlan.....	77
Figure 5. Release curves obtained from curdlan-anthocyanin particles made with (■) 4.3 %, (●) 5.1 % e (▲) 5.6 % of curdlan.....	79

RESUMO GERAL

Dentre as várias opções de espécies frutíferas com boas perspectivas de comercialização, surge a amora-preta (*Rubus* spp.) como umas das mais promissoras. A amora-preta é uma pequena fruta que tem apresentado sensível crescimento nos últimos anos no Rio Grande do Sul, Sul de Minas Gerais e tem elevado potencial para ser cultivada no estado de São Paulo. No Rio Grande do Sul, a amora-preta tem tido grande aceitação pelos produtores, devido ao seu baixo custo de produção, facilidade de manejo, rusticidade e pouca utilização de defensivos agrícolas.

Muitos fitoquímicos presentes em amora-preta exibem propriedades benéficas à saúde, como compostos fenólicos, com destaque para os pigmentos antociânicos. Estes pigmentos, que conferem a coloração atraente à fruta, possuem baixa estabilidade frente a algumas condições do meio como pH neutro e alcalino, alta temperatura e presença de luz. Assim, através deste estudo foram determinados espectrofotometricamente o teor de alguns compostos bioativos presentes em amora-preta cultivar Tupy, como antocianinas totais, monoméricas, poliméricas e copigmentadas, além de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e carotenóides. A atividade antioxidante foi avaliada frente aos radicais ABTS e DPPH. Por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), acoplada em série a detectores de arranjo de diodos (PDA) e de espectrômetro de massas (MS) foram identificadas as antocianinas e os carotenóides presentes no extrato de amora.

Com o intuito de aumentar a estabilidade das antocianinas, o extrato antociânico da amora-preta foi encapsulado utilizando a técnica de gelificação térmica. O material de parede selecionado foi a curdlana por não perder a capacidade gelificante em pH abaixo de 2. Após o processo de encapsulação foram avaliadas algumas características das partículas como o tamanho médio, a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação do recheio.

As antocianinas identificadas em amora-preta foram cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-dioxalil-glucosídeo, cianidina 3-malonil-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo. A antocianina majoritária foi a cianidina 3-glucosídeo perfazendo 92,9 % da área total. O teor de antocianinas totais foi de $90,5 \pm 0,1$ mg/100 g, sendo composto por $76,2 \pm 0,3$ % de monoméricas, $22,8 \pm 0,4$ % de poliméricas e $1,6 \pm 0,1$ % de copigmentadas. As antocianinas monoméricas foram encontradas como $104,1 \pm 1,7$ mg em cianidina 3-glucosídeo/100 g de fruta.

Foi observado que a amora-preta possui baixo teor de carotenóides ($86,5 \pm 0,1$ µg/100 g) e os carotenóides encontrados foram: all-*trans*-β-caroteno (39,6 %), all-*trans*-luteína (28,2 %), all-*trans*-β-criptoxantina (13,9 %), 9-*cis*-β-caroteno (3,8%), all-*trans*-α-caroteno (3,3 %), 13-*cis*-β-criptoxantina (3,1 %), all-*trans*-zeaxantina (2,7 %), 13-*cis*-β-caroteno (1,7 %), 5,6-epóxi-β-criptoxantina + fitoeno (0,8%), além de um carotenóide não identificado representando 2,9 %.

Com a presença de elevados teores de compostos fenólicos totais ($241,7 \pm 0,8$ mg/100 g) e de flavonóides totais ($173,7 \pm 0,7$ mg/100 g), pode-se concluir que estes compostos presentes na amora-preta foram os principais responsáveis pela elevada capacidade antioxidante avaliada pela habilidade de capturar radicais livres ABTS (TEAC $2209,7 \pm 68,4$ mM/ g) e DPPH (EC₅₀ $33,8 \pm 1,8$ g amostra/g DPPH).

As partículas formadas por gelificação térmica com 4,3, 5,1 e 5,6 % de curdlana apresentaram forma esférica e multinucleada. A distribuição de tamanho apresentou perfil semelhante para as diferentes concentrações de curdlana, embora as partículas obtidas com maior concentração de curdlana (5,6 %) apresentaram maior uniformidade no tamanho, maior umidade e maior eficiência de encapsulação. O perfil de liberação de todas as partículas contendo antocianinas apresentou cinética exponencial de primeira ordem, com total liberação nos primeiros 20 minutos em tampão pH 1,0.

SUMMARY

Among the fruit species with good perspectives for commercialization, blackberry fruit (*Rubus* spp.) is one of the best options. Blackberry is a small fruit, which has been increasingly cultivated in Rio Grande do Sul State, South of Minas Gerais State, also presenting high potential for cultivation in São Paulo State. In Rio Grande do Sul, blackberry has been widely accepted by the farmers, due to its low production cost, easy handling, rusticity and use of low amounts of agricultural defensives.

Several phytochemicals found in blackberry, such as phenolic compounds and anthocyanins, show beneficial health properties to humans. The anthocyanins, responsible for the attractive color of blackberries, possess low stability in some medium conditions, such as neutral and alkaline pH, high temperature and presence of light. Thus, using spectrophotometric methods, the levels of some bioactive compounds were determined in blackberries cv. Tupy, such as total anthocyanins, monomeric, polymeric and copigmented anthocyanins, as well as phenolic compounds, total flavonoids and total carotenoids. The antioxidant activity was determined using the free radicals ABTS and DPPH. Both anthocyanins and carotenoids from blackberry extracts were separated and identified by high performance liquid chromatography (HPLC) connected in series to diode array (PDA) and mass spectrometer (MS) detectors

In order to increase the anthocyanin stability, the anthocyanic blackberry extract was encapsulated by thermal gelification. Curdlan was the wall material selected, since the gel formed was stable in pH values lower than 2. After the encapsulation process, some particle characteristics, such as medium size, encapsulation efficiency and release profile, were evaluated.

The anthocyanins identified in blackberry were cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-dioxalyl-glucoside, cyanidin 3-malonil-glucoside and cyanidin 3-rutinoside. The major anthocyanin was cyanidin 3-glucoside, representing 92.9 % of the total area. The levels of total anthocyanins were 90.5 ± 0.1 mg/100 g,

composed by 76.2 ± 0.3 % of monomeric, 22.8 ± 0.4 % of polymeric and 1.6 ± 0.1 % of copigmented ones. The monomeric anthocyanins were quantified as 104.1 ± 1.7 mg of cyanidin 3-glucoside/100 g of fruit.

The levels of carotenoids found in blackberry were low (86.5 ± 0.1 $\mu\text{g}/100$ g), represented by all-*trans*- β -carotene (39.6 %), all-*trans*-lutein (28.2 %), all-*trans*- β -cryptoxanthin (13.9 %), 9-*cis*- β -carotene (3.8%), all-*trans*- α -carotene (3.3 %), 13-*cis*- β -cryptoxanthin (3.1 %), all-*trans*-zeaxanthin (2.7 %), 13-*cis*- β -carotene (1.7 %), 5,6-epoxy- β -cryptoxanthin + phytoene (0.8%), and a not identified carotenoid representing 2.9 %.

The elevated levels of phenolic compounds (241.7 ± 0.8 mg/100 g) and flavonoids (173.7 ± 0.7 mg/100 g) are most probably responsible for the high antioxidant activity against the free radicals ABTS (TEAC 2209.7 ± 68.4 mM/100g) and DPPH (EC_{50} 33.8 ± 1.8 g sample/g DPPH).

The particles formed by thermal gelification with 4.3, 5.1 and 5.6 % of curdlan presented spherical and multinucleated forms. The profiles of the size distribution were similar for all curdlan concentrations; although the particles with the highest curdlan concentration (5.6 %) showed highest size distribution uniformity, highest moisture and highest encapsulation efficiency. The release profile of anthocyanins from all particles followed first-order kinetics, with total release in 20 minutes in buffer pH 1.0 under agitation at room temperature.

INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo comercial da amora-preta (*Rubus* spp.) teve início na Europa, no século 17, quando a cultivar Evergreen foi selecionada como material nativo. Nos Estados Unidos, sua exploração comercial começou entre 1850 e 1860, segundo a Embrapa (www.cpact.embrapa.br). No Brasil, as primeiras plantas foram introduzidas em 1972, por meio do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado da Embrapa, de Pelotas (Rio Grande do Sul), que selecionou cultivares de Arkansas (EUA). Posteriormente, a Embrapa Clima Temperado desenvolveu um programa de melhoramento genético, a fim de adaptar as variedades estrangeiras ao clima e às exigências de consumo do Brasil. A cultura de amora-preta foi estendendo-se para o norte do Rio Grande do Sul, além de Santa Catarina, Paraná, sul de Minas e São Paulo (Martins & Junior, 1999; www.cpact.embrapa.br).

Além de suas características atrativas de cor e sabor, algumas propriedades benéficas são atribuídas às frutas de amoreira-preta, como anti-neurodegenerativa, apoptose de células cancerígenas (Seeram *et al.*, 2006), antiinflamatória e antiproliferativa (Dai *et al.*, 2007), complexação com metais e função antioxidante (Wang & Lin, 2000; Antunes, 2002).

Wang e Lin (2000) demonstraram em seus estudos que a atividade anti-radical livre presente em amoras-pretas está altamente associada ao elevado teor de antocianinas. Este pigmento que confere a forte coloração roxa na fruta foi encontrado em níveis de 70 a 200 mg/100 g de amora de diversas espécies de *Rubus* spp., entretanto os teores não diferiram significativamente entre as cultivares (Wrolstad *et al.*, 2005).

Outro estudo recente relacionando a capacidade antioxidante com o teor de antocianinas presentes em amora-preta, avaliou sua habilidade em seqüestrar radicais peróxidos e superóxidos. Os testes foram realizados antes e após o processamento térmico da amora cultivar Apache, demonstrando que o branqueamento e a pasteurização do suco não afetaram a capacidade

antioxidante, pois o aumento de antocianinas poliméricas compensou o decréscimo de antocianinas monoméricas após o processamento (Hager *et al.*, 2008).

Foi também demonstrado que o ácido elágico, presente na amora, possui funções antimutagênica, anticancerígena, além de ser um potente inibidor da indução química do câncer (Okuda *et al.*, 1985, Maas *et al.*, 1992 citados por Wang *et al.* 1994; Maas *et al.*, 1991).

Além de compostos fenólicos, como as antocianinas e o ácido elágico, estão presentes em *Rubus* spp. outros compostos bioativos como os carotenóides, porém em quantidades menos expressivas (Marinova & Ribarova, 2006).

De um modo geral, todos estes compostos presentes em amora-preta, considerados bioativos, podem atuar na saúde humana como quimioprotetores em virtude do seu potencial antioxidante. A capacidade de doar hidrogênios está associada à sua estrutura química e no caso de compostos fenólicos, também ao impedimento estérico dos grupos substituintes do anel aromático (Brand-Williams *et al.*, 1995). Devido ao efeito benéfico à saúde, as antocianinas possuem um alto potencial para serem empregadas em alimentos industrializados, como corantes naturais (Prior, 2004; Hou, 1997). Entretanto, sua utilização ainda é restrita pela baixa estabilidade, demonstrada em diversos estudos com sistemas modelos e extratos alimentícios, com pH acima de 3, altas temperaturas, presença de luz ou oxigênio, ação das enzimas como fenoloxidase e β -glicosidase e na presença de ácido ascórbico (Francis, 1989; Mercadante & Bobbio, 2008).

Dentre as formas para aumentar a estabilidade das antocianinas, a microencapsulação é uma tecnologia relativamente nova que tem solucionado dificuldades no emprego de ingredientes alimentícios, uma vez que pode aumentar a estabilidade destes em condições ambientais adversas, como à presença de luz, oxigênio e pHs extremos (Balassa & Fanger, 1971).

A microencapsulação é definida como a tecnologia de empacotar ingredientes sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas capazes de liberar o recheio sob condições controladas (Benita, 1996). Para encapsular “flavors” e pigmentos o spray-drying é o processo mais utilizado, bem como a aplicação de gomas, maltodextrinas, proteínas e outros carboidratos como materiais de parede (Benita, 1996). Poucos estudos avaliaram a técnica de gelificação da curdlana, um polissacarídeo resistente a uma ampla faixa de pH (2 a 10), com o intuito de promover a proteção de pigmentos naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes, L.E.C. Amora-preta: Nova opção de cultivo no Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 32, 151-158, 2002.
- Balassa, L.; Fanger, G. Microencapsulation in the food industry. *CRC Critical Reviews in Food Science and Technology*, 2, 245-265, 1971.
- Benita, S. Microencapsulation methods and industrial application. Marcel Dekker Inc. New York, 1996.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25-30, 1995.
- Dai, J.; Patel, J.D.; Mumper, R.J. Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties. *Journal of Medicinal Food*, 10, 258-265, 2007.
- Francis, F.J. Analysis of anthocyanins. *In: Anthocyanin as food colors*. Markakis, P. Academic Press, London, 181-206, 1989.
- Hager, T.; Howard, L.R.; Prior, R.L. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 689-695, 2008.
- Hou, D.X. Potential mechanism of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 304-309, 1997.
- Maas, J.L.; Galletta, G.J.; Stoner, G.D. Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberry: a review. *HortScience*, 26, 10-14. 1991.
- Marinova, D.; Ribarova, F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 370-374, 2007.

-
- Martins, F. P.; Junior, M.J.P. Influência do espaçamento na produtividade da amora-preta cv. Ébano em Jundiaí; Bragantia, 58, nº 2 ISSN 0006-8705, 1999.
- Mercadante, A. Z.; Bobbio, F. O. Anthocyanins in foods: occurrence and physicochemical properties *In: Food Colorants: Chemical and Functional Properties*; Socaciu, C., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 241-276, 2008.
- Prior, R.L. Absorption and metabolism of anthocyanins potencial health effects. *Phytochemicals: Mechanisms of Action*; Meskin, M., Bildlack, W.R., Davies, A.J., Lewis, D. S., Randolph, R.K.; CRC Press: Boca Raton, 1-19, 2004.
- Seeram, N.P.; Adams, L.S.; Zhang, Y.; Lee, R.; Sand, D.; Scheuller, H.S.; Heber, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9329-9339, 2006.
- Wang, S.Y., Lin, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 140-146, 2000.
- Wang, S.Y.; Maas, J.L.; Payne, J.A. Ellagic acid content in small fruits mayhaws, and other plants. *Journal Small Fruit and Viticulture*, 2, 11-49, 1994.
- Wrolstad, R.E , Durst. R.W., Lee, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Food Science & Technology*, 16, 423-428, 2005.
- www.cpact.embrapa.br, consultado em Novembro de 2006.

OBJETIVOS

Devido ao aumento do cultivo e consumo de amora-preta (*Rubus* spp.) no Brasil, considerando seu elevado teor antociânico e ainda com o intuito de aumentar a estabilidade destes pigmentos, os objetivos do presente trabalho foram:

- 1) Quantificar alguns compostos bioativos, como fenóis totais, flavonóides totais, carotenóides e antocianinas totais, poliméricas, monoméricas e copigmentadas em amora-preta cultivada no Brasil.
- 2) Avaliar a atividade anti-radical livre da amora-preta frente aos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•].
- 3) Separar e identificar as antocianinas e os carotenóides presentes em amora-preta.
- 4) Encapsular extrato antociânico de amora-preta pelo processo de gelificação térmica utilizando curdlana e avaliar as melhores condições de encapsulação.
- 5) Avaliar o efeito do processo de gelificação térmica no perfil de antocianinas.
- 6) Caracterizar as partículas formadas por gelificação térmica quanto à morfologia de superfície, distribuição de tamanho e tamanho médio, cinética de liberação do recheio e eficiência de encapsulação.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Amora-preta

A amora-preta pertence à família das ROSACEAE, gênero *Rubus*, formando um grupo diverso e bastante difundido, para o qual se estima existir entre 400 a 500 espécies, incluindo framboesas e amoras-pretas cultivadas na América, Europa, África e Ásia (Lorensi *et al.*, 2006; Bassols, 1980, Santos *et al.*, 1997).

A amoreira-preta (*Rubus* spp.) é uma planta rústica, que apresenta frutas de qualidade nutricional e valor econômico significativo, cujo cultivo vem crescendo em diversas regiões do Brasil. No Rio Grande do Sul, a amoreira-preta possui grande aceitação pelos produtores, devido ao baixo custo de implantação e produção, facilidade de manejo e uso reduzido de defensivos agrícolas. Além do consumo *in natura*, a amora é destinada à produção de polpa, geléias, sucos naturais e tantos outros tipos de produtos (Antunes *et al.*, 2003). De acordo com Nelson e Tressler (1980), o grande mercado para produtos de amora-preta é gerado a partir do suco clarificado e concentrado, usado como base da elaboração de uma vasta gama de produtos, como caldas para sorvetes, geléias, xaropes, bebidas alcoólicas e refrescos. Também pode ser utilizado para confecção de misturas com suco de outras frutas.

A industrialização da amora-preta para exportação teve início em 1978, em Pelotas (RS). No entanto, em São Paulo pequenas indústrias de Campos do Jordão já se dedicavam no começo da década de 60 à produção de geléias de amora-preta e framboesa (www.cpact.embrapa.br). A cultivar Ébano também pode ser comercializada *in natura*, enlatada e utilizada como aditivo de cor e sabor em iogurtes e sorvetes (Bassols, 1980).

A variedade Ébano foi introduzida em 1981 pela Embrapa Clima Temperado como precursora das cultivares brasileiras e a primeira sem espinhos na haste. Depois, vieram as variedades Negrita (1983), Tupy e Guarani (1988) e Caingangue (1992). A cultivar Ébano se desenvolve bem em locais com menor número de horas de frio hiberna (menos de 400 horas com temperatura do ar

abaixo de 7,2 °C), por este motivo encontramos esta cultivar na região de Jundiaí (São Paulo), onde inúmeras pequenas propriedades possuem exploração agrícola não extensiva (Martins & Junior, 1999). Segundo a Embrapa, a cultivar mais comercializada no Brasil atualmente é a Tupy e em menor escala Guarani e Brazos, sendo espécies híbridas interespecíficas.

De acordo com Martins e Junior (1999), entre 1992 e 1994 houve crescimento na produção de amoreira-preta na região de Jundiaí de 1.786 para 2.893 kg por hectare/ano. Atualmente, estima-se que a produtividade pode alcançar até 10.000 kg/ha/ano, sob condições adequadas de cultivo (Chagas *et al.*, 2007), e a área cultivada com amora-preta no Brasil esteja ao redor de 250 hectares (Raseira, 2004). A cultura de amora-preta nos estados do Sul e Sudeste ocupa o segundo lugar dentre as pequenas frutas, com produção de 1.300 toneladas e área cultivada de 110 hectares (Pagot & Hoffmann, 2003).

As amoras-pretas (*Rubus* spp.), além de serem boas fontes de antioxidantes naturais (Wang *et al.*, 1997), vitaminas e minerais, são ricas em antocianinas, que lhe conferem a coloração vermelho púrpura; outros flavonóides e ácidos fenólicos (Heinonen *et al.*, 1998).

2. Compostos fenólicos em frutas vermelhas

Compostos fenólicos são importantes metabólitos secundários encontrados em frutas e vegetais. Quantidades significativas de compostos fenólicos são rotineiramente consumidas na dieta humana, contribuindo substancialmente como promotores da saúde, devido à atividade antioxidante. A funcionalidade destes compostos está correlacionada com suas ações inibidoras ou ativadoras de uma larga variedade de sistemas enzimáticos, como quelantes de metais ou sequestrantes de radicais livres (Garbisa *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2000). As substâncias fenólicas são classificadas de acordo com a sua estrutura, entre eles, ácidos fenólicos, como ácido elágico e ácido gálico, e flavonóides tais como as antocianinas e flavanol (Harborne *et al.*, 1975; Andersen & Jordheim, 2006) (Figura 1).

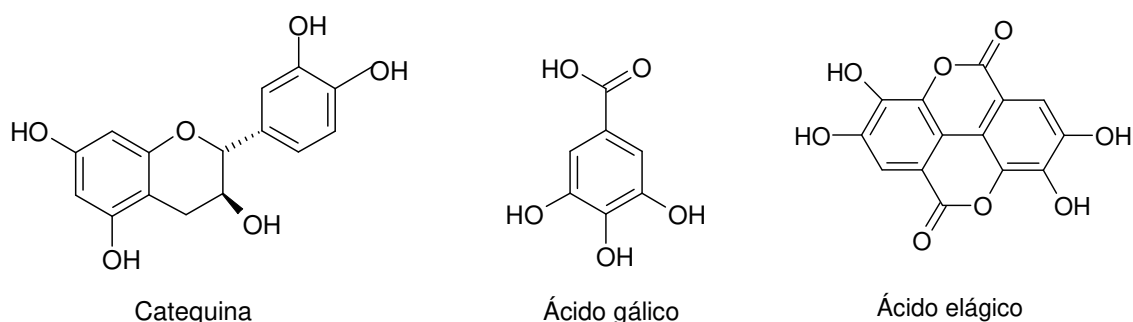


Figura 1: Estruturas de flavanol e ácidos fenólicos.

Considerando o mesmo tipo de fruta, o teor de fenóis totais encontrados depende da época de crescimento, variedade, condições climáticas e ambientais, localização geográfica e práticas agronômicas, e considerando o tratamento da amostra, depende da luz, temperatura e do método de extração (Benvenuti *et al.*, 2004; Kapasakalidis *et al.*, 2006).

O método Follin-Ciocalteau's (Singleton & Rossi, 1965) permite a determinação do valor estimado para todos os flavonóides, antocianinas e compostos não antociânicos, ou seja, quantifica todos os compostos fenólicos presentes na amostra (Benvenuti *et al.*, 2004).

Benvenuti *et al.* (2004) encontraram o valor médio de $289 \pm 55,8$ mg de compostos fenólicos por 100 g em seis cultivares de amoras-pretas (*Rubus fruticosus* L.), uma média de $177,5 \pm 52,2$ mg/100g em dois cultivares de framboesa (*Rubus idaeus* L.) e em três cultivares de groselha (*Ribes nigrum* L.) $417,9 \pm 72,6$ mg/100 g em média.

2.1. Flavonóides

2.1.1. Antocianinas

As antocianinas pertencem à classe dos flavonóides. São responsáveis pelas colorações vermelha, púrpura e azul presentes em frutas e vegetais. Foram

identificadas mais de 500 antocianinas na natureza, as quais possuem variações em sua estrutura por substituição glucosídica nas posições 3, 5 e 7 do cátion flavilium (2-fenilbenzopirilium) e acilação de açúcares com ácidos orgânicos, e por grupos hidroxílicos e metoxílicos no anel B (Wu & Prior, 2005; Lee *et al.*, 2005; Brouillard, 1982; Mercadante & Bobbio, 2008, Andersen & Jordheim, 2006) (Figura 2).

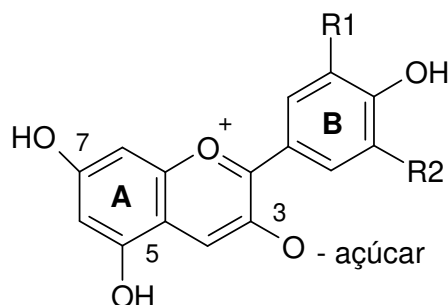


Figura 2: Estrutura do cátion flavilium. R1, R2 = H ou OH ou OCH₃.

A estabilidade das antocianinas e sua cor são altamente dependentes do pH, devido à mudança na concentração das quatro espécies: cátion flavilium, base quinonoidal, pseudobase ou carbinol e chalcona. A conversão de uma espécie em outra é tipicamente acompanhada pela drástica mudança na cor e estabilidade. A interconversão das quatro formas está apresentada nas equações 1 a 4, e na Figura 3 estão as estruturas antociânicas em ressonância, onde o cátion flavilium [AH⁺], de coloração vermelha, é a espécie mais estável em pH entre 1 e 2,4. O cátion AH⁺ possui a carga positiva concentrada principalmente no carbono 2 e, devido à alta densidade dos anéis, nesta posição ocorre o ataque nucleofílico. Na hidratação na posição 2 o cromóforo é interrompido, formando o hemiacetal (B) sem cor. Este anel pode ser tautomerizado formando *trans*-chalcona (C), que se isomeriza facilmente em *cis*-chalcona (C), ambas incolores. Outro deslocamento possível do equilíbrio é a desprotonação do cátion (AH⁺), e consequentemente a formação de bases quinonoidais (A), que possuem coloração azul devido à extensão do cromóforo (Brouillard, 1982).

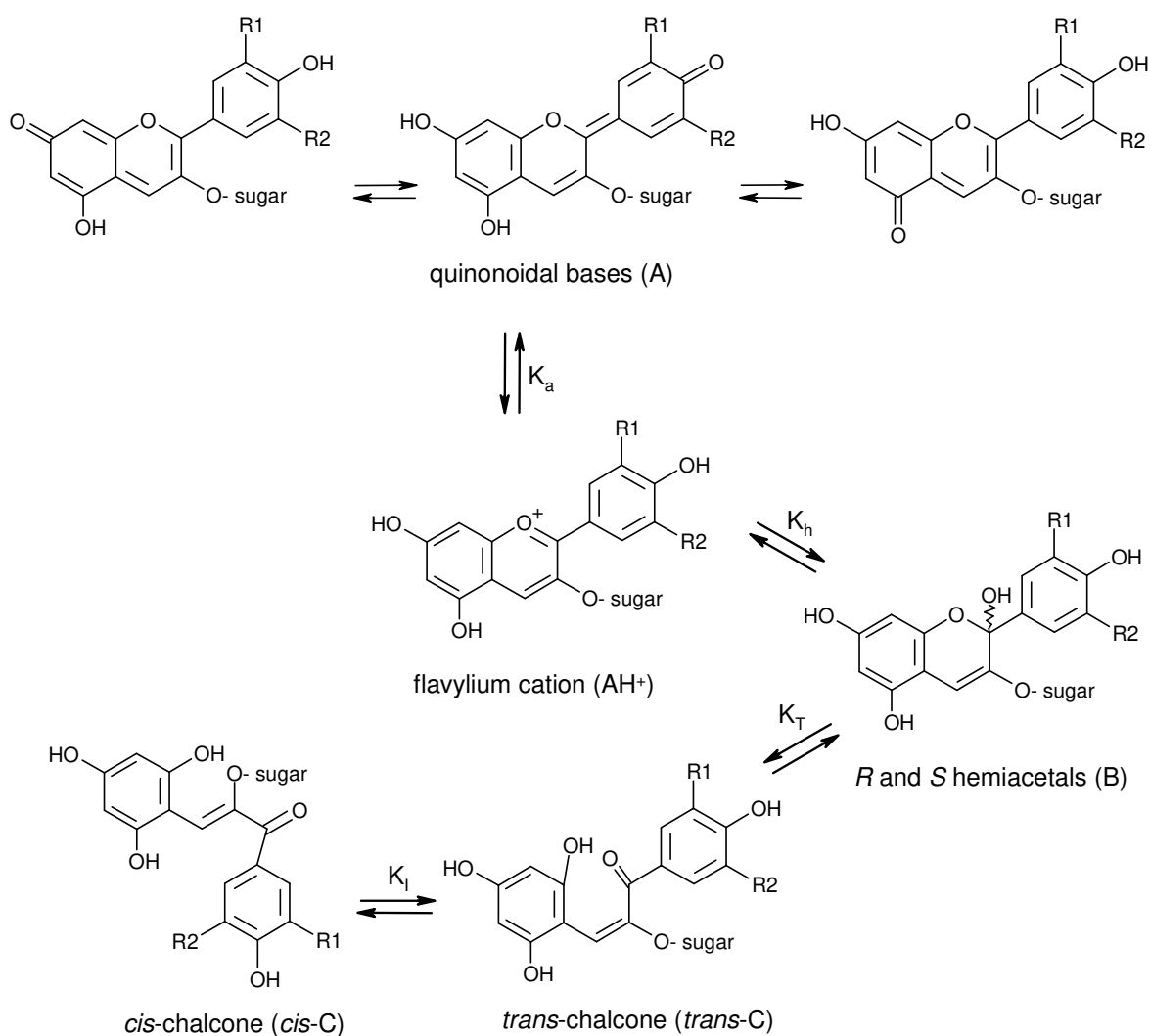
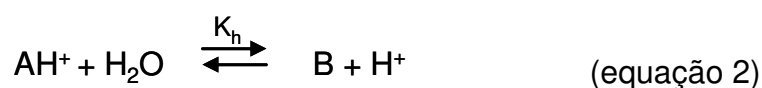


Figura 3: Equilíbrio das estruturas antociânicas em solução (Mercadante & Bobbio, 2008).

As equações 1, 2, 3 e 4 demonstram K_a = constante de equilíbrio ácido-base, K_h = constante de equilíbrio de hidratação, K_t = constante de equilíbrio de tautomerismo e K_i = constante de equilíbrio de isomerização (Brouillard, 1982; Houbiers *et al.*, 1998).



Outros fatores que podem promover a degradação das antocianinas incluem temperatura, oxigênio, enzimas, luz, acilação, copigmentação e íons metálicos (Cabrita *et al.*, 2000; Francis, 1989) o que dificulta sua aplicação como corante alimentício (Bakker & Timberlake, 1997).

Segundo Jackman e Smith (1996), as antocianinas encontram-se distribuídas em numerosas famílias de frutas, tais como: VITACEAE (uva), ROSACEAE (cereja, ameixa, framboesa, morango, amora, maçã, pêssego), SOLANACEAE (tamarindo), SAXIFRAGACEAE (groselha preta e vermelha) e ERICACEAE (mirtilo, oxicoco). Estas frutas podem representar importantes fontes naturais de corantes.

Benvenuti *et al.* (2004) avaliaram o teor de antocianinas pelo método pH diferencial em diversas cultivares de amoras-pretas (*Rubus fruticosus* L.) e encontraram, entre 67,4 a 126,9 mg /100 g, em framboesa (*Rubus idaeus* L.) na faixa de 29,2 a 41,2 mg/100 g e em groselha (*Ribes nigrum* L.) de 152,6 a 281,3 mg/100 g. Os autores determinaram também a atividade antioxidante dos extratos destas frutas *in natura* baseada na capacidade de seqüestrar o radical DPPH e concluíram que o resultado demonstra claramente um efeito sinérgico das antocianinas e demais compostos presentes.

Pantelidis *et al.* (2007) avaliaram o teor de antocianinas para *Cornus mas* - fruta vermelha semelhante à cereja - expressos como cianidina 3-glucosídeo de

223,0 $\pm$ 4,2 mg/100 g, amora-preta (*Rubus fruticosus*) de quatro cultivares variando entre 125,6 a 152,2 mg/100 g, framboesa (*Rubus idaeus*), também de quatro cultivares, de 35,1 a 49,1 mg/100 g, além de três cultivares híbridos das espécies *Rubus idaeus* e *Rubus fruticosus*, sendo Tayberry e Sunberry, com teores de 103,5 $\pm$ 7,8 e 175,8 $\pm$ 11,3 mg/100 g, respectivamente, e Silvan com 197,8 $\pm$ 18,3 mg de antocianina por 100 g de fruta. As frutas são provenientes da mesma fazenda do norte da Grécia e os resultados de antocianinas determinados por pH diferencial estão de acordo com a intensidade de cor observadas nas cultivares, sendo que a framboesa varia de amarelo a vermelho, a amora-preta possui coloração vermelho rubro e as espécies híbridas estão entre o vermelho e o preto.

Wu e Prior (2005) identificaram e caracterizaram nove antocianinas em amoras-pretas (*Rubus laciniatus* Willd) congeladas provenientes do estado de Oregon (EUA), identificando como majoritária a cianidina 3-glucosídeo (Figura 4), que também foi encontrada por Stintzing *et al.* (2002) para a mesma cultivar de amora com área de 82,6 % do espectro a 520 nm.

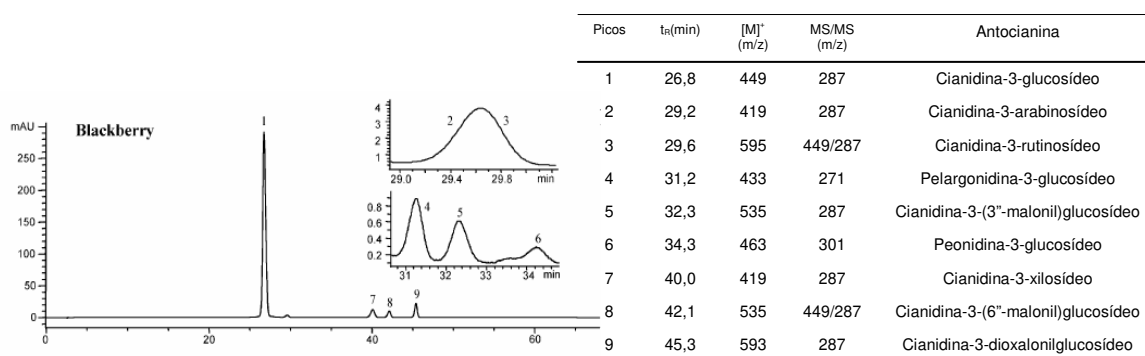


Figura 4. Cromatogramas de HPLC em fase reversa e perfil de antocianinas identificadas em amora-preta (*Rubus laciniatus* Willd). A peonidina foi identificada pela primeira vez nesta fruta. Fonte: Wu & Prior (2005).

Um estudo realizado em 18 cultivares de amora-preta, selecionadas no México e Chile, apresentaram antocianinas monoméricas na faixa de 70,3 a 201 mg/100 g e também apresentaram a cianidina 3-glucosídeo (Figura 5) como

majoritária, além de quatro minoritárias, cianidina 3-rutinosídeo, cianidina 3-xilosídeo, cianidina 3-malonil-glucosídeo e cianidina 3-dioxalil-glucosídeo (Fan-Chiang & Wrolstad, 2005).

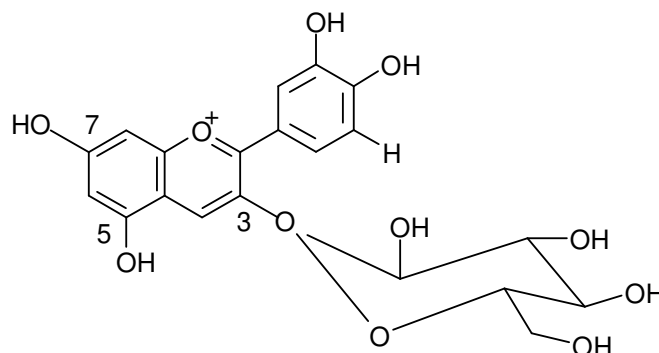


Figura 5: Estrutura da cianidina 3-glucosídeo.

2.2. Ácidos fenólicos

O ácido elágico é um ácido trihidroxibenzóico, derivado do ácido gálico por oxidação e dimerização, e é encontrado naturalmente em frutas na forma livre ou como elagitanino esterificado com glucose. Como fenol, possui algumas propriedades comuns a todos os compostos fenólicos. Foi encontrado em morango (*Fragaria* spp.), groselha preta (*Ribes nigrum*), amora-preta (*Rubus* subgênero *Eubatus*), framboesa (*Rubus* subgênero *Idaeobatus*), entre outras frutas (Wang *et al.*, 1994).

Foi demonstrado que o ácido elágico possui funções anti-mutagênica, anticancerígena, além de ser um potente inibidor da replicação do vírus HIV (Maas *et al.*, 1991).

Kapasakalidis *et al.* (2006), após a extração de compostos fenólicos de groselha (*Ribes nigrum*), adquirida em mercados de Coleford (Reino Unido), submeteram o resíduo remanescente a uma hidrólise ácida para liberação de antocianidinas e outros fenóis da parede celular. Estes compostos foram identificados e quantificados por HPLC por comparação com padrões. As antocianidinas encontradas foram delphinidina e cianidina. Foi encontrada uma faixa

de 114,0 a 868,0 mg de fenóis totais em 100g de fruta expressos como ácido gálico equivalente, determinado por Folin-Ciocalteu. Os autores concluíram que as antocianinas representam a maior classe de compostos fenólicos encontrados em groselha, perfazendo 87 a 95 %. Flavonol, expresso como quercetina 3-rutinosídeo, compreende 10 % do total de compostos fenólicos e ácidos hidroxicinâmicos, como ácido cafeico, representam uma porção significativa de 5,3 a 10,6 % do total de compostos fenólicos do extrato hidrolisado.

Siriwoharn *et al.* (2005) identificaram o ácido elágico e proteínas como principais componentes da sedimentação de suco concentrado de amora-preta (*Rubus laciniatus* L.), cultivar Evergreen. Os extratos de compostos fenólicos foram hidrolisados e injetados em HPLC, resultando em cerca de 0,05 g por 100 g de sedimentado fresco e 7,41 g por 100 g de extrato sedimentado liofilizado. Após a hidrólise ácida o sedimentado liofilizado resultou em um aumento no conteúdo de ácido elágico (10,8 g/100 g), apoiando a hipótese dos autores de que a hidrólise de elagitaninos, compostos fenólicos encontrados em amora-preta (cerca de 68,2 mg/100 g), leva à formação de ácido elágico não solúvel em água, desenvolvendo o papel principal na sedimentação do suco de amora.

Pinto *et al.* (2007) também analisaram o conteúdo fenólico e de ácido elágico, após a hidrólise do extrato, em geléia de morango (*Fragaria ananassa* Dush.) adquirida em mercados de São Paulo (Brasil). Foi encontrado de 17,0 a 29,5 mg/100 g de ácido elágico, enquanto o conteúdo fenólico total variou entre 58 e 136 mg de ácido gálico equivalente por 100 g de geléia.

Sellappan *et al.* (2002) identificaram em amora-preta (*Rubus* L.) proveniente do estado da Geórgia (EUA) vários ácidos fenólicos, como o ácido gálico de 4,12 a 6,42 mg/100 g, ácido cafeico de 1,38 a 3,64 mg/100 g, ácido *p*-coumárico de 0,40 a 2,08 mg/100 g, ácido ferrúlico de 2,99 a 3,51 mg/100 g e ácido elágico de 30,01 a 33,81 mg/100 g.

3. Carotenóides

Carotenóides são os pigmentos mais difundidos na natureza encontrados em frutas, vegetais, alguns animais e microorganismos e apresentam várias ações e funções benéficas ao ser humano. O papel reconhecido mais importante dos carotenóides na dieta humana é como precursor de vitamina A. O β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina são exemplos de carotenóides que possuem atividade provitamina A em função de sua estrutura química (Figura 6) (Rodriguez-Amaya, 1999; Krinsky, 2001).

A estrutura básica dos carotenóides é composta por 8 unidades de isoprenóides ligadas de tal forma que a molécula é linear com simetria invertida no centro. Possuem um sistema de ligações duplas conjugadas na cadeia poliênica e podem apresentar ou não anel nas extremidades e grupos funcionais (Figura 6). Estas propriedades influenciam na capacidade de absorver luz na região do visível, na cor, na utilização como corante alimentício, bem como nas propriedades funcionais (Britton, 1995).

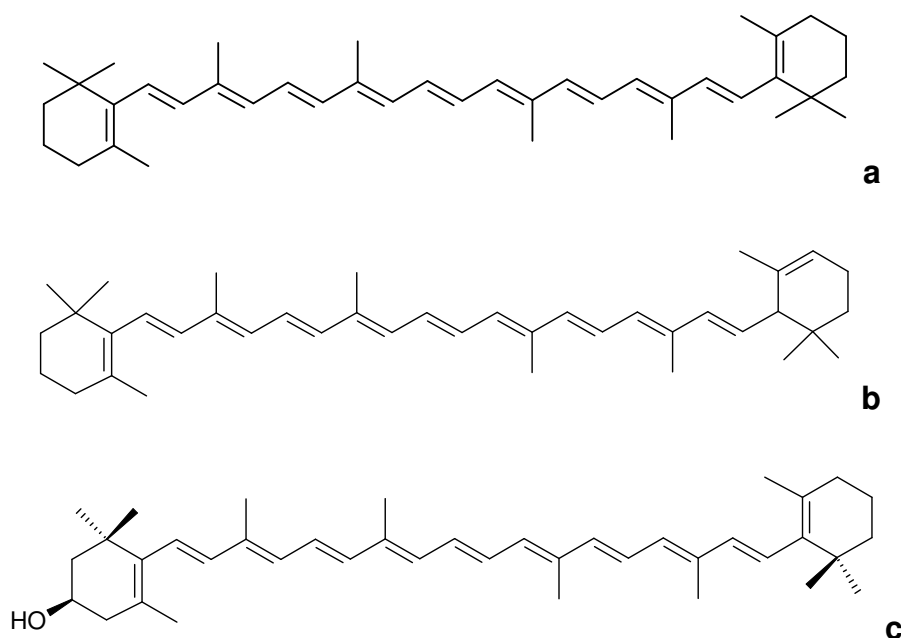


Figura 6: Estruturas do β -caroteno (a), α -caroteno (b) e β -criptoxantina (c).

As informações sobre a composição de carotenóides em amora-preta (*Rubus* spp.) ainda são escassas (Heinonen *et al.*, 1989; Marinova & Ribarova, 2007), bem como em frutas que se destacam por sua coloração predominantemente vermelha, levando os pesquisadores à idéia de baixo teor de carotenóides. Em 1964 as amoras-pretas foram caracterizadas por Curl como frutas de baixo teor de carotenóides (580 µg/100 g de fruta fresca), assim como mirtilo, “cranberry” e morango, localizados geralmente nos cloroplastos.

Segundo Marinova e Ribarova (2007) foram encontradas luteína (270 ± 33 µg/100 g), β-caroteno (100 ± 13 µg/100 g), β-criptoxantina ($30 \pm 3,7$ µg/100 g), α-caroteno ($9,2 \pm 0,7$ µg/100 g) na espécie *Rubus fruticosus* L. (amora-preta) da Bulgária. O conteúdo total de carotenóides encontrados foi de 440 µg/100 g. Os valores determinados para luteína e β-caroteno neste estudo foram considerados altos comparando com outras frutas vermelhas como morango (*Fragaria vesca* L.) e groselha (*Ribes rubrum* L.), açaí (Silva & Mercadante, 2002) e “cranberry” (Heinonen *et al.*, 1989). No entanto, para framboesa (*Rubus ideaus* L.) os teores de luteína e α-caroteno, este encontrado somente em framboesa e amora, foram os mais elevados em relação às outras frutas (Tabela 1).

A Tabela 1 apresenta algumas frutas vermelhas cujos principais carotenóides foram investigados. As diferentes composições de carotenóides para a mesma fruta devem-se à variabilidade biológica, influência de condições climáticas e taxa de exposição solar, o que afeta a biossíntese de carotenóides nas frutas vermelhas (Marinova & Ribarova, 2007).

No entanto, comparando os resultados de antocianinas e carotenóides em frutas vermelhas, e ainda considerando a coloração das mesmas, a quantidade expressiva de antocianinas acaba mascarando a cor dos carotenóides. Deste modo, frutas como amora-preta, não é considerada boa fonte de carotenóides, porém estão presentes nestas frutas como substâncias biologicamente ativas que contribuem para a atividade antioxidante juntamente com as antocianinas (Marinova & Ribarova, 2007).

Tabela 1. Composição de carotenóides em frutas vermelhas.

Frutas vermelhas	Carotenóides majoritários	Teores	Referências
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)	β -caroteno	160,0 ^a	Silva & Mercadante (2002)
	luteína	90,0 ^a	
Ameixa (<i>Prunus domestica</i> L.)	β -caroteno	25,0 ^b	Gross (1984)
	<i>cis</i> -violaxantina	27,2 ^b	
Amora-preta (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	luteína	44,3 ^b	Curl (1964)
Amora-preta (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	luteína	270,0 ^a	Marinova & Ribarova (2007)
	β -caroteno	100,0 ^a	
	β -criptoxantina	30,0 ^a	
	α -caroteno	9,2 ^a	
Cereja doce (<i>Prunus avium</i>)	luteína	14,2 ^b	Gross (1985)
	<i>cis</i> -violaxantina	15,7 ^b	
Cranberry (<i>Vaccinium macrocarpon</i> Ait.)	luteína	31,3 ^b	Curl (1964)
	violaxantina	20,7 ^b	
Cranberry (<i>Vaccinium oxycoccus</i>)	luteína	28,0 ^a	Heinonen <i>et al.</i> (1989)
	β -caroteno	22,0 ^a	
Morango (<i>Fragaria ananassa</i>)	luteína	20,6 ^b	Gross (1982)
Morango (<i>Fragaria vesca</i> L.)	luteína	21,0 ^a	Marinova & Ribarova (2007)
	β -caroteno	4,9 ^a	
Morango (<i>Fragaria</i> spp.)	luteína	31,0 ^a	Heinonen <i>et al.</i> (1989)
	β -caroteno	8,9 ^a	
Groselha (<i>Ribes rubrum</i> L.)	luteína	47,0 ^a	Heinonen <i>et al.</i> (1989)
	β -caroteno	25,0 ^a	
Groselha (<i>Ribes rubrum</i> L.)	luteína	28,0 ^a	Marinova & Ribarova (2007)
	β -caroteno	13,0 ^a	
Mirtilo (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	luteína	39,2 ^b	Curl (1964)
Mirtilo (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	luteína	230,0 ^a	Marinova & Ribarova (2007)
	β -caroteno	49,0 ^a	
	zeaxantina	14,0 ^a	
Framboesa (<i>Rubus ideaus</i> L.)	luteína	320,0 ^a	Marinova & Ribarova (2007)
	β -caroteno	9,3 ^a	
	α -caroteno	24,0 ^a	
	zeaxantina	11,0 ^a	

^a Teores expressos em $\mu\text{g}/100\text{ g}$.^b Teores expressos em %.

4. Microencapsulação

A microencapsulação é uma técnica de empacotamento na qual finas camadas poliméricas são aplicáveis em sólidos, gotículas de líquidos ou gases, formando pequenas partículas denominadas microcápsulas (Peterson & Johnston, 1978; Tood, 1970). As microcápsulas podem ser descritas como embalagens extremamente pequenas, compostas por um polímero como material de parede e um material ativo chamado de núcleo. O ingrediente ativo pode ser um aditivo alimentício, um medicamento, corante ou outros materiais (Arshady, 1993). Dentre os materiais que podem ser encapsulados, para aplicação na indústria alimentícia, incluem-se ácidos, bases, óleos, vitaminas, sais, gases, aminoácidos, “flavors”, pigmentos, enzimas e microrganismos (Jackson & Lee, 1991).

O principal objetivo da microencapsulação é proteger o material de recheio das condições adversas do meio como luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos, estabilizando o produto, aumentando a vida útil e promovendo a liberação controlada do encapsulado em condições pré-estabelecidas (Shahidi & Han, 1993).

A escolha correta do material de parede da microcápsula é um dos pontos críticos da microencapsulação, é importante verificar suas características físico-químicas, solubilidade, cristalinidade, capacidade de formação de filme e propriedades de barreira (Arshady, 1993). O agente encapsulante deverá proteger o componente ativo, prolongar o tempo de vida-de-prateleira, obter um produto final com escoamento livre, de fácil manuseio e que se incorpore em alimentos (King *et al.*, 1976). Para tanto, o material de parede escolhido deve possuir propriedades capazes de reter o material de recheio, propriedades emulsificantes, facilidade de manipulação, além de baixa viscosidade e não ser reativo com o recheio da partícula. Os materiais mais comuns são gomas vegetais, amido modificado, dextrinas e lipídios (Jackson & Lee, 1991).

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas para microencapsulação de ingredientes alimentícios, sendo que a seleção do método é dependente da

aplicação que será dada à cápsula ou partícula, tamanho desejado, mecanismo de liberação e propriedades físico-químicas tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (Jackson & Lee, 1991). Técnicas como spray drying, coacervação complexa, gelificação e “hot melting” podem ser aplicadas na microencapsulação (Raghavan *et al.*, 1990; Sankarikutty *et al.*, 1988; Arshady, 1993).

4.1. Encapsulação de antocianinas

A encapsulação de antocianinas com polímeros naturais pode ser utilizada como uma alternativa para aplicação industrial. Através deste procedimento é esperado um aumento de sua estabilidade, além de permitir uma liberação controlada deste ingrediente funcional no corpo humano (Xiong *et al.*, 2006) ou em alimentos. No entanto, existem poucos estudos sobre encapsulação de antocianinas.

Xiong *et al.* (2006) encapsularam o extrato de groselha preta, adquirido comercialmente da New Zealand Pharmaceuticals Ltda, com a aplicação de glucana para formação de cubos e cápsulas pelo método de gelificação a 80°C-90°C. As cápsulas de antocianinas formadas foram secas por diferentes métodos e após a secagem, foi analisada a recuperação do recheio com solução pH 1,2 HCl/KCl por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados mostraram que a alta recuperação das antocianinas de groselha preta, considerando os parâmetros do estudo, luz, temperatura e oxigênio, seguiu a seguinte ordem decrescente: secagem por liofilização por 12 horas (83,3 a 84,4 %), secagem à vácuo a 1kPa e 40°C (77,2 a 83,8 %) e secagem em forno convencional a 40°C (72,8 a 78,7 %). Somente para a secagem das cápsulas com infravermelho a 38,9°C houve baixa recuperação das antocianinas, ocasionada pela redução da estabilidade das antocianinas. Portanto, os autores concluíram que a encapsulação de antocianinas com polímeros naturais podem promover o aumento da estabilidade para eficientes aplicações em sistemas alimentícios.

Utilizando a técnica de spray-drying, foi observado que a maltodextrina 20-23 DE como material de parede proporciona um maior rendimento em pó de

antocianinas ($630,92 \pm 15,71$ mg de antocianinas/100 g de pó) extraídas de cenoura (*Daucus carota* L.), sendo 28,45 % mais alto em comparação às maltodextrinas 10 DE e 28-31 DE. Os autores alegaram que temperaturas de entrada no spray-drying acima de 160-180 °C provocam degradação do extrato antociânico encapsulado (Ersus & Yurdagel, 2007).

4.2. Gelificação iônica e térmica

O processo de produção de partículas por gelificação iônica é simples e de baixo custo, ocorrendo quando uma solução polimérica aquosa contendo nutrientes é gotejada sobre uma solução iônica em concentrações adequadas. Mediante esta técnica, o material de recheio é acondicionado dentro de pequenas gotas dispersas em uma camada aquosa, envolta por uma parede gelificada (Okhamafe, 1996), podendo-se obter razoáveis níveis de recheio e cápsulas de diferentes formas e tamanhos (Willaert & Baron, 1996). A gelificação térmica parte do mesmo princípio, porém sem a necessidade de elétrons no meio gelificante, utilizando somente os parâmetros temperatura e polaridade.

Cápsulas produzidas por gelificação térmica ou iônica são formadas em meio aquoso sob agitação ou através de um reator tubular (Thies, 1995).

Bustos *et al.* (2003) prepararam cápsulas contendo ácidos graxos poliinsaturados ω -3 e o carotenóide astaxantina, a partir de uma suspensão aquosa de óleo de camarão e quitosana. O objetivo foi utilizar as propriedades físicas de barreira do polissacarídeo como um protetor contra a degradação oxidativa do óleo, aplicado como suplemento alimentar para larvas de peixes. A emulsão de quitosana, óleo, tween 20 e ácido acético foi adicionada lentamente à uma mistura de hidróxido de sódio e etanol (4:1) sob agitação, formando uma parede firme da microcápsula. O conteúdo de ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa, a taxa de oxidação foi avaliada pelo cálculo de polienos formados com o tempo e o carotenóide quantificado por HPLC. Os autores referem-se aos resultados como estabilidade oxidativa e concluíram que a microencapsulação não promoveu um efeito positivo ou protetor para a

astaxantina ou para o ácido graxo poliinsaturado ω -3 após 25 dias de encubação em temperatura ambiente em ausência de luz.

4.2.1. Polissacarídeos como materiais de parede

Hidrocolóides são polímeros hidrofílicos geralmente constituídos de grupos hidroxílicos e podem ser polieletrólitos. São utilizados para modificar a textura de diversos alimentos, previnem a recristalização do gelo, são estabilizantes, floculantes, e uma função em particular é a propriedade de formar gel em processos de encapsulação, despertando o interesse em vários estudos e nas indústrias alimentícia, farmacêutica e médica. Em aplicações práticas de hidrocolóides, estes são primordialmente polissacarídeos, porém algumas proteínas podem ser usadas (Burey *et al.*, 2008). Dentre os polissacarídeos, as gomas são obtidas de plantas ou por processos microbiológicos que ao se dispersarem em água fria ou quente, produzem o efeito espessante ou gelificante (Zanaloni, 1992).

Entre os hidrocolóides utilizados como barreira na proteção de alimentos, quer na forma de filmes ou microcápsulas, encontram-se amidos, maltodextrinas, pectinas de baixo teor de esterificação, além de gomas como glucana, carragena e alginato de cálcio, sendo que os quatro últimos requerem um íon para a reticulação da matriz (Mukai-Correa *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2006; Ersus & Yurdagel, 2007). Com a propriedade de gelificação térmica, destaca-se a goma curdlana, que é o terceiro polissacarídeo produzido industrialmente por fermentação, depois das gomas xantana e gelana (Cunha *et al.*, 2004).

Para qualquer material de parede utilizado no processo de microencapsulação, as propriedades do gel obtido são afetadas pela concentração do hidrocolóide, concentração de íons (para alginato e pectina), além do método de preparação (Burey *et al.*, 2008). Cápsulas preparadas por gelificação iônica com goma gelana e pectina apresentaram melhores barreiras contra a difusão da caseína quando comparadas com cápsulas preparadas com alginato e misturas ternárias (Mukai-Correa *et al.*, 2007).

4.2.1.1. Curdlana

A curdlana é um polímero formado por ligações glucosídicas β 1 $\rightarrow$ 3 (Figura 7) facilmente encontrada na natureza em plantas, fungos e leveduras como constituintes da parede celular ou como polissacarídeos de reserva. Porém, foi por volta de 1960 que Tokuya Harada descobriu a curdlana em bactéria *Alcaligenes faecalis* var. *Myxogenes*, onde a principal propriedade é a formação de gel em suspensão aquosa submetida a elevadas temperaturas (Fumani *et al.*, 1999a; Hadara & Yoshimura, 1965).

Em suspensão aquosa a curdlana possui a capacidade de formar dois tipos de géis de acordo com a temperatura de aquecimento. O gel denominado “low-set” é formado quando a suspensão aquosa de curdlana é aquecida a temperatura de 50 a 60 °C e então resfriada a temperaturas inferiores a 40 °C, este é um gel termorreversível similar ao agar-agar e à gelatina. Já o gel formado quando a solução aquosa de curdlana é aquecida a temperaturas superiores a 80 °C é denominado de “high-set”, sendo irreversível e bastante estável a uma ampla faixa de congelamento e frente a tratamentos com altas temperaturas, permanecendo insípido e incolor (Funami *et al.*, 1999b, Glicksman, 2000, Burey *et al.*, 2008).

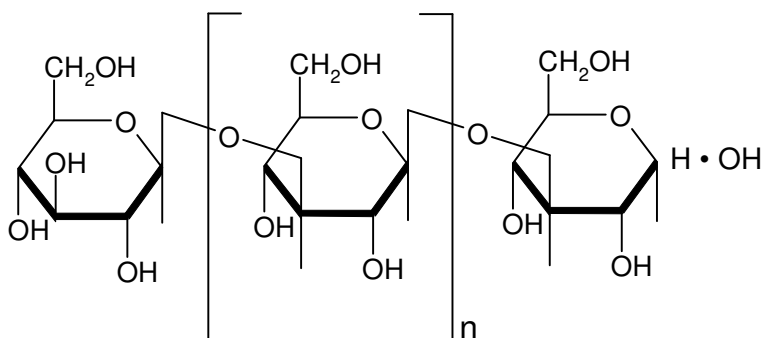


Figura 7: Estrutura da curdlana.

A curdlana apresenta massa molecular de aproximadamente 74 000 daltons e é produzida industrialmente pela “Takeda Chemical Industries”, no Japão, através de processo fermentativo (Funami *et al.*, 1999a). É comercializada

na forma de pó, obtido através do método spray-dring, sendo bastante estável neste estado e composta de aproximadamente 90 % de carboidratos e 10 % de umidade (Seguchi & Kusunose, 2001; Yukihiro, 1997).

4.2.1.2. Alginato

O alginato é um hidrocolóide natural muito utilizado na indústria alimentícia, como um agente espessante, gelificante. São extraídos primordialmente de três espécies de algas *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*, e de bactérias como *Azotobacter vinelandii* e espécies de *Pseudomonas* (Gombotz & Wee, 1998).

A estrutura química do alginato é uma cadeia linear não ramificada de ligações 1,4' unidas por β -D-ácido manurônico e α -L-ácido gulurônico, que variam em composição e extensão da cadeia, o que determina o peso molecular (20 000 a 600 000 daltons) e suas propriedades físicas (Onsoyen, 1997; Gombotz & Wee, 1998).

Cápsulas de alginato podem ser preparadas extrusando a solução de alginato de sódio contendo o material de interesse, como gotas em uma solução contendo cátions divalentes, como Ca^{+2} , Sr^{+2} ou Ba^{+2} . A gelificação do polímero é alcançada principalmente pela troca dos íons sódio do ácido gulurônico com cátions divalentes, ligando as cadeias de grupos gulurônicos, que são empilhados formando uma estrutura tipo “caixa de ovos”. Estas cadeias formadas podem se unir a outras, através de zonas de junção, formando um gel estável dependendo da origem do alginato (Rees, 1981; Onsoyen, 1997).

Para aplicação do alginato em sistemas alimentícios, estudos prévios são necessários considerando a temperatura, pH, solubilidade e a presença de agentes sequestrantes que, combinados com a fonte de cálcio poderá promover a gelificação ideal, por meio de liberação controlada do cálcio (Onsoyen, 1997).

A quebra da matriz formada pelo alginato pode ocorrer por hidrólise catalizada por próton, reduzindo o peso molecular do alginato o qual resulta em uma rápida degradação e liberação (Mumper *et al.*, 1994).

4.2.1.3. Pectina

Como um dos principais produtos obtidos a partir do aproveitamento de resíduos agrícolas, a pectina é obtida comercialmente de casca de cítricos, de polpa de maçã, e resíduos da indústria de açúcar de beterraba. Portanto, a pectina é extraída de vegetais comestíveis e usada amplamente como agente gelificante e estabilizante pela indústria alimentícia (May, 1997; Glicksman, 2000; Burey *et al.*, 2008).

A pectina é um grupo de polissacarídeos, com função estrutural, formado por ligações α -1,4 de ácido D-galacturônico. Até 20 % dos carboidratos da molécula de pectina são açúcares neutros, como D-glucose, L-arabinose e L-ramnose, sendo que o esqueleto principal da molécula pectica é formado por cadeias lineares de ácido D-galacturônico com massa molecular de 110 000 a 150 000 daltons. A porcentagem de grupos carboxílicos esterificados por grupos metoxílicos indica o grau de esterificação ou teor de metoxilação, que pode ser controlado durante o processo de extração, fazendo com que a taxa varie de 0 a 75 %. Abaixo de 50 % de grau de metoxilação a pectina é denominada de BTM (baixo teor de metoxilação). O tratamento para preparação da pectina com amônia dissolvida em metanol, converte alguns grupos metil ester em grupos carboxinamidas, formando assim pectina de baixo teor de metoxilação (BTM), produtos conhecidos como pectinas (BTM) amidadas (May, 1997).

As pectinas com alto teor de metoxilação (ATM), formam gel quando submetidas em solução aquosa com teor de sólidos solúveis de 65 % e pH ajustado entre 2,8 a 3,5. O ajuste de pH nesta faixa neutraliza as cargas dos grupos carboxílicos e evita sua ionização. A sacarose desidrata a pectina neutralizada, formando pontes intermoleculares prendendo a água e formando gel. Em valores de pH abaixo de 2 a pectina é hidrolisada. As pectinas de baixo teor

de metoxilas (BTM) formam géis estáveis na ausência de açúcares, porém requerem a presença de íons bivalentes, como Ca^{+2} , o qual provoca a formação de ligações cruzadas entre as moléculas (Gliksman, 2000).

5. Referências Bibliográficas

- Andersen, O. M.; Jordheim, M. The anthocyanins. *In*: Markham, K.R. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, cap. 10, 471-545, 2006.
- Antunes, L.E.C.; Filho, J.D.; Souza, C.M. de. Conservação pós-colheita e frutos de amoreira-preta: pesquisa agropecuária brasileira. Brasília, 38, 2003.
- Arshady, R. Microcapsules for food. *Journal of Microencapsulation*, 10, 413-435, 1993.
- Bakker, J.; Timberlake, C.F. Isolation, identification and characterization of new color stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 35-43, 1997.
- Bassols, M. do C. A cultura da amora-preta. Pelotas : Embrapa/UEPAE e Cascata, 11p., (CircularTécnica, 4), 1980.
- Benvenuti, S.; Pellati, F.; Melegari, M.; Bertelli, D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of Food Science*, 69, 164-169, 2004.
- Britton, G. UV/visible Spectroscopy. *In*: Carotenoids: spectroscopy. Britton, G. Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds.). Birkhauser, Basel, 13-62, 1995.
- Brouillard, R. Anthocyanins as Food Colors, Academic Press: New York, 1982.
- Burey, P.; Bhandari, B.R.; Howes, T.; Gidley, M.J. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 361-377, 2008.

- Bustos, R.; Romo, L., Yáñez, K., Díaz, G., Romo, C. Oxidative stability of carotenoid pigments and polyunsaturated fatty acids in microparticulate diets containing krill oil for nutrition of marine fish larvae. *Journal of Food Engineering*, 56, 289-293, 2003.
- Cabrita, L.; Fossen, T.; Andersen, M. Colour and stability of the six common anthocyanins 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 68, 101-107, 2000.
- Chagas, E.A.; Pio, R.; Barbosa, W.; Dall'Orto, F.A.C.; Mendonça, V. Amora-preta: a pequena fruta com elevado potencial de cultivo. 2007. Artigo em Hipertexto disponível em: www.infobibos.com/Artigos/2007_2/amora/index.htm.
- Cunha, M.A.A., Santos, J.C., Gómez, R.J.H.C., Silva, S.S. Goma curdlana: propriedades e aplicações. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 3, 55-61, 2004.
- Curl, A. L. The carotenoids of several low-carotenoid fruits. *Journal of Food Science*, 29, 241-245, 1964.
- Ersus, S.; Yurdagel, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 800, 805-812, 2007.
- Fan-Chiang, H.J.; Wrolstad, R.E. Anthocyanin pigment composition of blackberries. *Journal of Food Science*, 70, 198-202, 2005.
- Francis, F.J. Analysis of Anthocyanins. *In: Anthocyanin as food colors*. Markakis, P. Academic Press, London, 181-206, 1989.
- Funami, T.; Funami, M.; Yada, H.; Nakao, Y. Gelation mechanism of curdlan by dynamic viscoelasticity measurements. *Journal of Food Science*, 64, 129-132, 1999a.

-
- Funami, T.; Funami, M.; Tawada, T.; Nakao, Y. Decreasing oil uptake of doughnuts during deep-fat frying using curdlan. *Journal of Food Science*, 64, 883-888, 1999b
- Garbisa, S.; Sartor, L.; Biggin, S.; Salvato, B.; Benelli, R.; Albini, A. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer*, 91, 822-832, 2001.
- Glicksman, M. *Food Hydrocolloids*, 1, CRC Press, 85-155, 2000.
- Gombotz, W.R.; Wee, S.F. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, 267-285, 1998.
- Gross, J. Changes of chlorophylls and carotenoids in developing strawberry fruits (*Fragaria ananassa*) cv. Tenira. *Gartenbauwiss*, 47, 142-144, 1982.
- Gross, J. Carotenoid pigments in three plum cultivars. *Gartenbauwiss*, 49, 18-21, 1984.
- Gross, J. Carotenoid pigments in the developing cherry (*Prunus avium*) cv. 'Dönissen's Gelbe'. *Gartenbauwiss*, 50, 88-90, 1985.
- Hadara, T.; Yoshimura, T. Rheological properties of succinoglucan 10C3 from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*. *Agricultural Biology Chemistry*, 29, 1027, 1965.
- Harborne, J.B.; Mabry, T.J., Mabry, H.; *The flavonoids*, Academic Press: New York, 1975.
- Heinonen, I. M.; Meyer, A. S.; Frankel, E. N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4107-4112, 1998.

- Heinonen, I.M.; Ollilainen, V.; Linkola, E.K.; Varo, P.T.; Koivistoinen, P.E. Carotenoids in Finnish foods: vegetables, fruits, and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 655-659, 1989.
- Houbiers, C.; Lima, J. C.; Maçanita, A. L.; Santos, H. Color stabilization of malvidin-3-glucoside: self-aggregation of flavylium cation e copigmentation with the Z-chalcone form. *Journal of Physical Chemistry*, 102, 3578-3585, 1998.
- Jackman, R.L.; Smith, J.L. Anthocyanins and betalains. *In*: Hendry, G.A.F.; Houghton, J.D. *Natural Food Colorantes*. 2^a Ed. London: Chapman & Hall, 245-309, 1996.
- Jackson, L.S.; Lee, K. Microencapsulation and food industry, *Lebensmittel-Wissenschaftat Technologie*, 24, 289-297, 1991.
- Kapasakalidis, P.G.; Rastall, R.A.; Gordon, M.H. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4016-4021, 2006.
- King, W., Trubiani, P., Perry, P. Modified starch-encapsulating agents offer superior emulsification, filming, and low surface oil. *Food Product Development*, 12, 54-57, 1976.
- Krinsky, N.I. Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*, 17, 815-817, 2001.
- Lee, J.; Durst, R.W.; Wrolstad, R.E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88, 1269-1278, 2005.
- Lorenzi, H.; Bacher, L.; Lacerda, M. e Sartori, S.: *Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)*. Instituto Plantarium, 2006.
- Maas, J.L.; Galletta, G.J.; Stoner, G.D. Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberry: a review. *HortScience*, 26, 10-14, 1991.

- Marinova, D.; Ribarova, F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 370-374, 2007.
- Martins, F. P.; Junior, M.J.P. Influência do espaçamento na produtividade da amora-preta cv. Ébano em Jundiaí; *Bragantia*, 58, 317-321, 1999.
- May, C.D. Pectins. *In: Thickening and gelling agents for food*. 2^a Ed. Imeson, A., Blackie Academic & Professional, London, Cap.11, 230-260, 1997.
- Mercadante, A. Z.; Bobbio, F. O. Anthocyanins in foods: occurrence and physicochemical properties. *In: Food Colorants: Chemical and Functional Properties*; Socaciu, C., Ed.; CRC Press: Boca Raton, cap. 4.3, 241-276, 2008
- Mukai-Correa, R.; Prata, A.S.; Alvim I. D; Grosso, C.R.F. Controlled release of protein microencapsulated by ionic gelation. *Current Drug Delivery*, 1, 265-273, 2007.
- Mumper, R.J.; Hoffman, A.S.; Puolakkainen, P.; Bouchard, L.S.; Gombotz, W.R.. Calcium-alginate beads for the oral delivery of transforming growth factor- β : stabilization of TGF- β , by the addition of polyacrylic acid within acid-treated beads. *Journal Control Release*, 30, 241-251, 1994.
- Nelson, P. E.; Tressler, D. K. Fruit and vegetable juice processing technology, 3^a ed., Westport: AVI. 597p., 1980.
- Okhamafe, A.O. Modulation of protein release from chitosana-alginate microcapsules using the pH-sensitive polimer hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate. *Journal of Microencapsulation*, 13, 497-508, 1996.
- Onsoyen, E. Alginates. *In: Thickening and gelling agents for food*. 2^a Ed. Imeson, A., Blackie Academic & Professional, Londres, Cap.2, 22-42, 1997.
- Pagot, E.; Hoffmann, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. *In: Seminário Brasileiro Sobre Pequenas Frutas 1, Vacaria. Anais, Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho*, 7, 7-15, 2003.

- Pantelidis, G.E.; Vasilakakis, M.; Manganaris, G.A.; Diamantidis, Gr. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102, 777-783, 2007.
- Peterson, M.S., Johnston, A.M. Microencapsulation. *In: Encyclopedia of Food Science*, AVI Publishing Co., 499-507, 1978.
- Pinto, M.S.; Lajolo, F.M.; Genovese, M.I. Bioactive compounds and antioxidant capacity of strawberry jams. *Plant Foods Human Nutrition*, 62, 127-131, 2007.
- Raghavan, B., Abraham, K.O.; Shankaranarayana, M.L. Encapsulation of spice oleoresins and other flavour materials. *Indian Perfumer*, 34, 75–85, 1990.
- Raseira, M.C.B. A pesquisa com amora-preta no Brasil. *In: Simpósio Nacional do Morango*, 2: Encontro de pequenas frutas e frutas nativas, 1. Pelotas, 2004. Palestra: Embrapa Clima Temperado, 2004. 219-223. (Embrapa Clima Temperado. Doc.124).
- Rees D.A. Polysaccharide shapes and their interactions – some recent advances. *Pure Applied Chemistry*, 53, 1-14, 1981.
- Rodriguez-Amaya, B.D. A guide to carotenoids analysis in foods. Washington, D.C.: International Life Science Institute, 64p., 1999.
- Russo, A.; Acquaviva, R.; Campisi, A.; Sorrenti, V.; Di Giacomo, C.; Virgata, G.; Barcellona, M.L.; Vanella, A. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biological Toxicological*, 16, 91-98, 2000.
- Sankarikutty, B.; Sreekumar, M.M.; Narayanan, C.S.; Mathew, A.G. Studies on microencapsulation of cardamom oil by spray drying technique. *Journal of Food Science and Technology*, 25, 352–356, 1988.
- Santos, A.M.; Raseira, M.C.B.; Madail, J.C.M. Amora-preta. 2. ed. Brasília: Embrapa-SPI; Pelotas: Embrapa-CPACT. 61 p. (Coleção Plantar, 33), 1997.

-
- Seguchi, M.; Kusunose, C. Liophilization of curdlan granules by heat-treatment or chlorination. *Food Hydrocolloids*, 15, 177-183, 2001.
- Sellappan, S.; Akoh, C.C.; Krewer, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2432-2488, 2002.
- Shahidi, F., Han, X. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 501-547, 1993.
- Silva, S.R., Mercadante, A.Z. Composição de carotenóides em polpa congelada de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). *Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2002 (disponível em CD).
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158, 1965.
- Siriwoharn, T.; Wrolstad, R.E.; Durst, R.W. Identification of ellagic acid in blackberry juice sediment. *Food Chemistry and Toxicology*, 70, C189-C197, 2005.
- Stintzing, F.C.; Stintzing, A.S.; Carle, R.; Frei, B.; Wrolstad, R.E. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6172-6181, 2002.
- Thies, C. How to make microcapsules: combined lecture and laboratory manual. Thies Technology, St. Louis, Missouri, 1995.
- Tood, R.D. Microencapsulation and flavour industry. *Flavour Industry*, 1, 768-771, 1970.
- Wang, H., Cao, G., Prior, R.L., Oxygen radical absorbing capacity anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 304-309, 1997.

-
- Wang, S.Y.; Maas, J.L.; Payne, J.A. Ellagic acid content in small fruits mayhaws, and other plants. *Journal Small Fruit and Viticulture*, 2, 11-49, 1994.
- Willaert, R.G.; Baron, G.V. Gel entrapment and microencapsulation: methods, applications and engineering principles. *Reviews in Chemical Engineering*, 12, 5-205, 1996.
- Wu, X., Prior, R.L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Fruits and Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2589-2599, 2005.
- www.cpact.embrapa.br, consultado em Novembro de 2007.
- Xiong, S.; Melton, L.D.; Easteal, A.; Siew, D. Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucana gel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6201-6208, 2006.
- Yukihiro, N. Properties and food applications of curdlan. *Agro-Food-Industry Hi-Tech*, Paris, Jan./Feb., 1997.
- Zanaloni, E. Uso de gelificantes y espesantes en heladeria. *Heladeria Panaderia Latinoamericana*, 19, 39-46, 1992.

CAPÍTULO II

COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES EM AMORA-PRETA

Artigo em preparação para o periódico
Ciência e Tecnologia de Alimentos

RESUMO

A amora-preta (*Rubus* spp.), pequena fruta de clima temperado, possui coloração atraente, variando do vermelho púrpura ao azul, devido ao elevado teor de antocianinas. As antocianinas, juntamente com os carotenóides, compõem a maior classe de pigmentos naturais encontrados em diversas frutas. Diversos estudos têm relatado a importância destes pigmentos naturais como protetores e/ou inibidores de doenças degenerativas, porém são escassos os estudos sobre compostos bioativos presentes em amora-preta cultivada no Brasil. Os objetivos do presente estudo foram determinar o conteúdo total de compostos fenólicos, flavonóides, antocianinas totais, monoméricas, poliméricas e copigmentadas e a capacidade antioxidante frente aos radicais ABTS e DPPH, além de identificar as antocianinas e os carotenóides presentes em amora-preta (*Rubus* spp.) por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos e detector de espectrometria de massas (HPLC-PDA-MS/MS). As amoras-pretas apresentaram elevado potencial antioxidante principalmente pelo teor representativo de antocianinas monoméricas ($104,1 \pm 1,7$ mg/100 g de fruta), presença de antocianinas poliméricas ($22,8 \pm 0,4$ %) e baixa porcentagem de antocianinas copigmentadas ($1,63 \pm 0,06$ %). Cianidina 3-glucosídeo foi a antocianina majoritária (92,9 %). Além disso, foram encontrados $241,7 \pm 0,8$ mg/100 g de compostos fenólicos e $173,7 \pm 0,7$ mg/100 g de flavonóides totais. Foram encontrados em amoras-pretas β -caroteno (39,6 %) e luteína (28,2 %) como os carotenóides majoritários, embora o teor total tenha sido baixo (86,5 μ g/100 g). Diante destes resultados, a amora-preta pode ser boa fonte natural de antioxidantes e rica em antocianinas.

Palavras-chaves: amora-preta, flavonóides, compostos fenólicos, antocianinas, carotenóides.

1. INTRODUÇÃO

As antocianinas e os carotenóides são pigmentos naturais, presentes em diversas frutas, capazes de conferir, além da coloração atraente e característica, diversos benefícios à saúde humana, sendo considerados, portanto, compostos bioativos (45).

Dentre as funcionalidades dos carotenóides, além da atividade pró-vitamina A, estes compostos atuam supostamente como protetores frente à doenças degenerativas como o câncer, degeneração macular causada pela idade, catarata e doenças cardiovasculares (23, 33).

Foco de diversos estudos na atualidade, estão os compostos fenólicos, e dentro desta classe, os flavonóides antociânicos, associados à redução do risco de doenças coronarianas, inibição da oxidação das LDL (39), além de auxiliarem no tratamento de doenças inflamatórias, circulatórias, diabetes e obesidade (44, 17, 8), e possuírem capacidade antiproliferativa de células humanas cancerígenas (47).

O efeito protetor contra a incidência destas doenças degenerativas tem sido relacionado com o poder antioxidantes dos compostos presentes em frutas e vegetais. As antocianinas possuem a capacidade de doar hidrogênios ou elétrons aos radicais livres (7, 36), já os carotenóides são considerados excelentes desativadores de oxigênio singlete (26). WANG & LIN (46) demonstraram que a atividade anti-radical livre presente em amoras-pretas está altamente associada ao elevado teor de antocianinas.

A amora-preta (*Rubus* spp.), pequena fruta nativa da Europa e implantada no Brasil pela Empraba através de alterações genéticas, é bastante apreciada para o preparo de sobremesas, geléias, sorvetes e sucos, além do grande interesse de produtores para o cultivo orgânico, devido ao baixo custo de implantação e uso reduzido de defensivos agrícolas. Estas “berries” são boas

fontes naturais de antioxidantes (45), vitaminas e minerais, e são ricas em ácidos fenólicos e flavonóides.

As antocianinas, responsáveis pela forte coloração vermelha púrpura na fruta, foram encontradas em níveis de 70 a 200 mg/100 g em diversas espécies de *Rubus* spp (48,12). MARINOVA & RIBAROVA (25) encontraram um alto conteúdo de antocianinas em amoras-pretas (*Rubus fruticosus* L.), totalizando 440 mg/100 g. Para esta mesma espécie de amora, em seis cultivares, BENVENUTTI *et al.* (2) reportaram o valor médio de $289 \pm 55,8$ mg de compostos fenólicos totais por 100 g de fruta e MARINOVA & RIBAROVA (25) encontraram o teor de 440 µg de carotenóides/100 g de amora-preta.

O presente trabalho teve por objetivos avaliar a composição de antocianinas e de carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-PDA-MS/MS), além de verificar o potencial funcional da amora-preta cultivada no Brasil, determinando as diferentes formas de antocianinas (totais, monoméricas, poliméricas e copigmentadas), compostos fenólicos totais, flavonóides totais e a capacidade antioxidante (radicais ABTS e DPPH).

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Amostra

Dois lotes de 10 kg de amoras-pretas (*Rubus* spp.), espécie híbrida cultivar Tupy, foram adquiridos no CEASA – Campinas SP – no período de safra, entre novembro e dezembro de 2006. As frutas inteiras foram armazenadas em freezer a -60 °C.

2.2. Materiais

O padrão de catequina foi obtido da Fluka (Steinheim, Alemanha), ácido gálico e os padrões de antocianinas da Extrasynthèse (Genay, França). Os padrões de carotenóides foram cedidos pela DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland).

Os reagentes [2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] (ABTS^{•+}), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]), Trolox e o persulfato de potássio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Chemie, Alemanha). O reagente de Folin-Ciocalteu foi fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha). Os solventes e ácidos grau p.a. utilizados para a extração foram provenientes da Labsynth (Diadema, Brasil). Os solventes grau cromatográfico (HPLC) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) ou da Mallinckrodt Baker (Philipsbrug, Estados Unidos). A água foi purificada por um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, Estados Unidos), e as amostras e os solventes foram filtrados utilizando, respectivamente, membranas de 0,22 e 0,45 µm da Millipore.

2.3. Equipamentos

Os compostos bioativos foram quantificados em espectrofotômetro de absorção UV-visível de arranjo de diodos (modelo 8453, Agilent, Santa Clara, Estados Unidos).

As análises de carotenóides e antocianinas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com sistema de bombeamento quaternário (modelo LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japão), ligado a um desgaseificador e válvula injetora Rheodyne com alça de 20 µL, acoplado em série a um detector de arranjo de diodos (PDA) (Shimadzu, modelo SPD-M20A) e um espectrômetro de massas com analisador ion trap (MS/MS), modelo Esquire 4000 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), com fontes de ionização "eletronspray ionization" (ESI) e "atmospheric pressure chemical ionization" (APCI).

2.4. Extração de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram extraídos segundo o método de KIM, JEONG & LEE (22). Cerca de 10 g de amora-preta descongelada foi utilizada para extração com 100 mL de solução metanol:água (8:2) em ultra-som por 20 minutos em atmosfera de nitrogênio. A amora com o solvente foram filtrados em funil de Buchner, lavando com 50 mL de metanol. A extração se repetiu exaustivamente e

o filtrado transferido a um evaporador rotatório ($> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) com auxílio de metanol:água (8:2). O extrato concentrado foi dissolvido em 50 mL de metanol e o volume completado com água destilada até 100 mL. A solução foi, então, centrifugada por 20 min e armazenada em freezer ($-36\text{ }^{\circ}\text{C}$) até a análise. As extrações foram realizadas em duplicata.

2.4.1. Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, segundo SINGLETON & ROSSI (41) utilizando 1 mL do extrato obtido no item 2.4 ou das soluções padrões de ácido gálico (20, 40, 60, 80 e 100 mg/L), adicionado a um balão volumétrico de 25 mL contendo 9 mL de água destilada, onde adicionou-se 1 mL do reagente Folin. Após 5 minutos, foram adicionados 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 7,5 % (m/v). A reação ocorreu durante 2 horas no escuro e a absorbância foi monitorada a 740 nm em espectrofotômetro. O teor de CFT foi determinado utilizando uma curva padrão de ácido gálico com as seguintes concentrações finais: 0,01, 0,04, 0,07, 0,10 e 0,13 mg/mL. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (GAE)/100 g de amora-preta.

2.4.2. Determinação de flavonóides totais

Os flavonóides totais foram determinados segundo ZHISHEN, MENGCHENG & JIANMING (51). Em um balão de 10 mL, contendo 4 mL de água destilada, foi adicionado 1 mL extrato obtido no item 2.4 ou das soluções padrões de catequina (20, 40, 60, 80 e 100 mg/L). No tempo zero, adicionou-se 0,3 mL de NaNO_2 5 % (m/v) e após 5 minutos, foi adicionado 0,3 mL de AlCl_3 10 % (m/v). No tempo 6 min, 2 mL de NaOH 1 M foi adicionado e a solução agitada com auxílio de ultra-som. A seguir, o volume foi completado com água destilada. A leitura da absorbância foi realizada a 510 nm em espectrofotômetro. As amostras foram preparadas em triplicata, além de um balão com o branco. O total de flavonóides foi expresso em mg de catequina equivalente (CE)/100 g de amora-preta.

2.5. Análise de Antocianinas

2.5.1. Antocianinas Totais

A quantificação de antocianinas totais foi realizada segundo o método descrito por FRANCIS (13). As amoras congeladas trituradas foram extraídas exaustivamente em homogeneizador (Metabo, Nürtingen, Alemanha) com a solução etanol 95 %/HCl 1,5N (85:15). A mistura foi armazenada sob ausência de luz a 4 °C por 16 horas, para depois ser filtrada à vácuo e lavada com etanol acidificado. Após ajustar o volume com o solvente extrator, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-visível a um comprimento de onda de 535 nm. A extração foi realizada em duplicata.

O cálculo do teor de antocianinas totais contidas na amora foi realizado de acordo com a equação 1, onde A é absorbância, FD fator diluição e $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ absorvidade de 98,2 L/g x cm, para “cranberry” (14).

$$\text{Antocianinas totais} = \frac{A \times \text{FD}}{A_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (\text{equação 1})$$

2.5.2. Antocianinas Monoméricas

A determinação de antocianinas monoméricas foi realizada segundo LEE, DURST & WROLSTAD (24). Foram preparadas soluções tampão pH 1,0 (cloreto de potássio 0,025 M) e pH 4,5 (acetato de sódio 0,4 M) com 30 minutos de antecedência.

As amoras congeladas trituradas foram extraídas com solução metanólica, acidificada com HCl 1 %, a temperatura ambiente sob ausência de luz. A seguir a solução foi filtrada e o resíduo submetido à extração exaustiva. A solução obtida após a filtração foi misturada com as anteriores e o extrato total concentrado em

evaporador rotatório (<38 °C) até evaporação do metanol, obtendo-se desta forma o extrato bruto. O extrato foi diluído em água Milli-Q e o fator diluição determinado com uma alíquota do extrato diluído em solução tampão pH 1,0 até absorbância em torno de 0,8 a 520 nm em espectrofotômetro de absorção UV-visível.

Com a diluição pré estabelecida, foram preparadas duas soluções com a mesma quantidade de extrato diluído em tampão pH 1,0 e tampão pH 4,5, as quais ficaram em repouso por 30 minutos na ausência de luz para estabilizar as conformações antociânicas. Após este período foram realizadas as leituras da absorbância em espectrofotômetro a 520 e 700 nm. A quantificação de antocianinas monoméricas foi obtida a partir do cálculo da diferença entre os tampões pH 1,0 e pH 4,5 em comprimento de onda 520 e 720 nm. Os resultados foram expressos como mg de cianidina 3-glucosídeo por 100 g de fruta, conforme equação 2, sendo PM a massa molecular de 449,2 g/mol, FD fator diluição, ϵ coeficiente de extinção molar de 26900 L/cm x mol (20) e L caminho óptico em cm.

$$\text{Antocianinas monoméricas} = \frac{[(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}] \times \text{PM} \times \text{FD} \times 10^3}{\epsilon \times L}$$

(equação 2)

2.5.3. Antocianinas Poliméricas

Para a determinação de antocianinas poliméricas, foi aplicado o método descrito por MAZZA *et al.* (27) e GUTIÉRREZ (15).

O extrato antociânico diluído em água Milli-Q, obtido no item 2.5.2, foi ajustado a pH 3,6 com NaOH 4 N. Após centrifugação, em 2 mL de extrato foi adicionado 20 μL de acetaldeído 10 % (v/v) e após encubação na ausência de luz por 45 min, a leitura da absorbância foi realizada a 520 nm ($A_{\text{acet.}}$). Para outra alíquota de 2 mL do extrato foi adicionado 260 μL de bissulfito de sódio 5% (m/v) e

a absorvância A_{SO_2} foi medida também a 520 nm. Para antocianinas totais foi considerada a absorvância do extrato diluído a 520 nm ($A_{dil.}$). A distribuição em porcentagem de antocianinas copigmentadas, monoméricas e poliméricas foi obtida através das equações 3, 4 e 5, respectivamente:

$$\% \text{copigmentadas} = \frac{A_{\text{acet.}} - A_{\text{dil.}}}{A_{\text{acet.}}} \times 100 \quad (\text{equação 3})$$

$$\% \text{monoméricas} = \frac{A_{\text{dil.}} - A_{SO_2}}{A_{\text{acet.}}} \times 100 \quad (\text{equação 4})$$

$$\% \text{poliméricas} = \frac{A_{SO_2}}{A_{\text{acet.}}} \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

2.5.4. HPLC-PDA-MS/MS

Em 15 g de extrato bruto de antocianinas de amora-preta, obtido conforme descrito no item 2.5.2, foram adicionados 5 mL de solução aquosa de ácido fórmico 10 %, 50 mL de água Milli-Q, e lavado em funil de separação duas vezes com 150 mL de acetato de etila para a retirada de compostos apolares. A fase aquosa foi aplicada em uma coluna cromatográfica (CC) contendo resina Amberlite XAD-7 (60 x 3 cm). As antocianinas foram eluídas com a fase móvel metanol/ácido acético (19:1), segundo o método descrito por DEGENHARDT, KNAPP & WINTERHALTER (11). O extrato antociânico parcialmente purificado foi concentrado e armazenado a -36 °C. Imediatamente antes da análise, o extrato concentrado parcialmente purificado foi diluído em metanol/ácido fórmico 5 % (85:15).

A separação de antocianinas foi realizada em coluna C_{18} Shim-pack CLC-ODS com 250 x 4,6 i.d. mm e 5 μ m (Shimadzu, Canby, Estados Unidos), usando

como fase móvel um gradiente linear de ácido fórmico 5 %/metanol (v/v) de 85:15 para 20:80 em 25 min, mantendo esta proporção por 15 min. O fluxo foi de 0,9 mL/min e a temperatura de 25 °C. Os cromatogramas foram processados a 520 nm e os espectros obtidos entre 250 e 600 nm. Uma válvula foi inserida após o PDA de modo a dividir o fluxo da coluna, permitindo somente a entrada de 0,15 mL/min na câmara de ionização ESI. Os parâmetros MS-MS foram os seguintes: ESI modo positivo, voltagem no capilar 2500 V, end plate offset 2000 V, saída do capilar 110V, skimmer 1:20 V, skimmer 2:10 V, temperatura do gás de secagem (N₂) 325 °C e fluxo de 11 L/min, nebulizador 30 psi, faixa de varredura de *m/z* 100 a 800. O MS/MS foi adquirido no modo automático, aplicando energia de fragmentação de 1,2 V.

As antocianinas foram identificadas através das seguintes informações: comportamento cromatográfico (tempo de retenção), características dos espectros UV-visível e de massas, comparando com padrões e dados da literatura (12, 38, 40, 48).

2.6. Análise de Carotenóides

2.6.1. Extração

A extração foi realizada de acordo com MERCADANTE, RODRIGUEZ-AMAYA & BRITTON (30) utilizando cerca de 20 g de amora-preta descongelada. Em almofariz, misturou-se a amostra com Hiflosupercel e acetona para extração dos carotenóides. A mistura foi filtrada em funil de Büchner e o resíduo foi levado novamente ao almofariz. A extração e a filtração foram repetidas até que o resíduo se tornasse incolor, e os filtrados foram agrupados. Os carotenóides foram transferidos para éter etílico/éter de petróleo (1:1) em funil de separação, seguido de adição de água, separação das fases e descarte da fase inferior de água-acetona após cada adição. Quando todos os carotenóides estavam transferidos para o éter de petróleo, a fase etérea foi lavada quatro vezes com água para a remoção total da acetona. Em seguida, foi realizada a saponificação, com uma solução de KOH 10 % em metanol para hidrolisar os ésteres de xantofilas. A

mistura foi deixada no escuro durante 16 horas a temperatura ambiente. Após a saponificação, essa mistura foi levada a um funil de separação contendo o éter de petróleo/éter etílico (1:1), e lavada com água até retirada do álcali. À fase etérea recolhida foi adicionado sulfato de sódio anidro para remoção de qualquer resíduo de água. O extrato obtido foi concentrado em rota-evaporador ($T < 35\text{ }^{\circ}\text{C}$). A extração de carotenóides foi realizada em duplicata.

2.6.2. Carotenóides totais

A leitura de absorbância (A) do extrato obtido no item 2.6.1 diluído em éter de petróleo foi realizada em espectrofotômetro de absorção UV-visível a 450 nm, e o resultado de carotenóides totais em amora-preta foi expresso em termos de β -caroteno, conforme equação 6, onde absortividade ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) equivale a 2592 L/g x cm (5).

$$\text{Carotenóides totais} = \frac{A \times 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (\text{equação 6})$$

2.6.3. HPLC-PDA-MS/MS

Para a identificação de carotenóides, o extrato injetado foi preparado segundo o item 2.6.1. Imediatamente antes da análise, o extrato foi solubilizado em metanol/éter metil *terc*-butílico (50:50). A separação foi realizada em coluna C₃₀ YMC (3 μm , 250 x 4,6 mm i.d.) (Waters, Wilmington, Estados Unidos) empregando como fase móvel um gradiente linear de metanol/éter metil *terc*-butílico (EMTB) de 95:5 para 70:30 em 30 min, para 50:50 em 20 min, e mantendo esta proporção por 35 min. O fluxo seguiu em 0,9 mL/min e a temperatura da coluna foi de 22 $^{\circ}\text{C}$. Os espectros UV-visível foram obtidos entre 250 e 600 nm, e os cromatogramas foram processados a 450 nm. Os parâmetros do MS/MS foram: APCI, modo positivo, corrente de 4000 mA, temperatura da fonte de 450 $^{\circ}\text{C}$,

temperatura do gás de secagem (N_2) 350 °C e fluxo de 60 L/h, nebulizador 5 psi, faixa de varredura de m/z 100 a 700. O MS/MS foi adquirido no modo automático, aplicando energia de fragmentação de 1,4 V.

Os carotenóides foram identificados de acordo com uma combinação de informações: ordem de eluição, co-cromatografia com padrões, características dos espectros UV-visível ($\lambda_{\text{máx}}$, estrutura fina, intensidade do pico *cis*) e de massas comparados com dados da literatura (5, 25, 29, 31).

2.7. Determinação da atividade anti-radical livre

A atividade anti-radical livre dos extratos de amora-preta foi determinada frente ao DPPH• e ABTS•+. O extrato de compostos fenólicos totais, descrito no item 2.4, foi utilizado com os dois radicais, enquanto que o efeito anti-radical dos extratos de antocianinas monoméricas (item 2.5.2), poliméricas (item 2.5.3) e totais (item 2.5.1) foi analisado com o radical ABTS.

2.7.1. Método DPPH

Utilizou-se o método DPPH• segundo BRAND-WILLIAMS, CUVELIER & BERSET (4). A partir de uma concentração apropriada do extrato em metanol, foram adicionadas diferentes diluições (20, 40, 60, 80 100 e 120 µL) em 3,9 mL de solução de DPPH (6×10^{-5} M) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 515 nm, a cada 5 minutos até estabilização da absorbância, em torno de 30 minutos. Para realizar a curva padrão foi utilizado DPPH• em diferentes concentrações (50, 75, 100, 125, 150 e 200 µg/mL).

Para cada concentração de amostra, a porcentagem de DPPH• remanescente no “platot” (30 min) foi calculada de acordo com a equação 7. A atividade antioxidante foi expressa pelo coeficiente EC_{50} , definido como a quantidade necessária do composto antioxidante para o decréscimo de 50 % da concentração inicial do radical DPPH, e a eficiência antiradical (AE) foi calculada como $1/EC_{50}$.

$$\text{DPPH}_{\text{Rem}} \% = \frac{\text{DPPH}_{30 \text{ min}}}{\text{DPPH}_{t=0}} \times 100 \quad (\text{equação 7})$$

2.7.2. Método ABTS

A atividade antioxidante das amostras foi determinada através do método ABTS, segundo RE *et al.* (35).

Foram misturadas em partes iguais as soluções de ABTS 14 mM e persulfato de potássio 4,90 mM e mantida por 12 a 16 horas em temperatura ambiente no escuro. Após este tempo, a absorbância foi corrigida para $0,70 \pm 0,02$ em espectrofotômetro 734 nm com adição de etanol. Ao atingir a diluição desejada foram adicionados 20 μL da amostra ou do padrão, em diferentes concentrações, em 2 mL do radical ABTS e a absorbância foi lida em espectrofotômetro após 1 minuto, de tempos em tempos, até 6 minutos a 750 nm.

Foi construída a curva padrão de Trolox com as seguintes concentrações finais: 3, 6, 9, 12 e 15 μM , e a % de inibição, calculada segundo a equação 8, foi utilizada como referência para a determinação da capacidade antioxidante equivalente em Trolox (TEAC).

$$\% \text{Inibição} = \frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (\text{equação 8})$$

Onde $\text{Abs}_{\text{controle}}$ é a absorbância da solução controle de Trolox, $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorbância para as diferentes concentrações de Trolox ou de amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Compostos bioativos de amora-preta

A Tabela 1 apresenta os teores de compostos bioativos detectados na amora-preta, bem como a atividade anti-radical.

Tabela 1. Teores de compostos bioativos encontrados em amora-preta.

<i>compostos bioativos</i>	<i>concentração^a</i>
compostos fenólicos totais	241,7 ± 0,8 mg GAE ^b /100 g
flavonóides totais	173,7 ± 0,7 mg CE ^c /100 g
antocianinas totais	90,5 ± 0,1mg/ 100g
antocianinas monoméricas	104,1 ± 1,8 mg cyd 3-glu ^d /100 g
carotenóides totais	86,5 ± 0,2 µg/100 g
atividade anti-radical DPPH	33,8 ± 1,8 EC ₅₀ ^e
atividade anti-radical ABTS	2209,7± 68,4 mMTEAC/100 g

^a Média e desvio-padrão de análise em duplicata.

^b valores expressos em equivalente de ácido gálico.

^c valores expressos em equivalente de catequina.

^d cianidina 3-glucosídeo

^e g amostra/g DPPH

O alto teor de compostos fenólicos totais encontrados em amora-preta no presente estudo (Tabela 1) também foi reportado por diversos autores para amoras de cultivares diferentes encontradas nos Estados Unidos e Itália, com valores na faixa de 192,8 a 486,5 mg equivalente de ácido gálico /100 g (2, 40, 46, 47). Foi encontrado também um alto teor de flavonóides totais (Tabela 1). Entretanto, valores médios de 265,7 ± 11,5 mg equivalente de catequina/100 g de amora cultivar Kiowa foram reportados (40).

O conteúdo de antocianinas monoméricas encontrado em amora-preta está dentro da faixa de 67,4 a 248,0 mg/100 g de amoras-pretas, da família *Rubus* de diversas espécies e cultivares, já reportada anteriormente em outros estudos que

também apresentaram os resultados baseados na antocianina majoritária cianidina 3-glucosídeo (2, 12, 16, 34, 40, 46, 47). Esta ampla faixa de antocianinas encontrada em amoras se deve a possíveis alterações na composição das frutas de acordo com as condições climáticas, estágio de maturidade e cultivar.

Diversos estudos com frutas apresentam o valor total de antocianinas calculado de acordo com o método pH diferencial (22, 34, 42, 46), além de utilizarem o metanol acidificado com HCl como solvente extrator, partindo do princípio que antocianinas monoméricas perfazem a sua totalidade. A partir do cálculo proposto por FRANCIS (13), obteve-se um menor teor de antocianinas totais ($90,5 \pm 0,1$ mg/100 g) em comparação a antocianinas monoméricas ($104,1 \pm 1,8$ mg/100 g). Porém, comparando com o açaí, fruta considerada boa fonte de antocianinas ($50,0 \pm 5,0$ mg/100 g) (3), o valor foi consideravelmente maior utilizando o mesmo método e mesmo coeficiente de absorção ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 98,2$). O coeficiente proposto para o cálculo por FRANCIS (13) refere-se ao suco de “cranberry” em etanol acidificado, cuja antocianina majoritária é peonidina 3-galactosídeo, seguida da cianidina 3-galactosídeo (48), o que pode explicar esta diferença no teor antociânico. Outra explicação seria que o solvente utilizado no método, etanol 95 %/ HCl 1,5N (85:15), não garante a total extração de antocianinas, pois o metanol é 20 % mais eficiente que etanol e 73 % mais eficiente que água, em termos de extração de antocianinas, segundo METIVIER, FRANCIS & CLYDESDALE (32).

A proporção de antocianinas poliméricas, monoméricas e copigmentadas encontradas em amora-preta está representada na Figura 1. Um elevado teor de antocianinas poliméricas geralmente é encontrado em sucos com elevada concentração de antocianinas e vinhos, demonstrando que grande parte das antocianinas foram degradadas (15, 27). No entanto, como as frutas de amoreira-preta utilizadas para este estudo foram armazenadas a $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$, não houve degradação de antocianinas (16), ocasionando o baixo teor de antocianinas poliméricas ($22,9 \pm 0,4$ %).

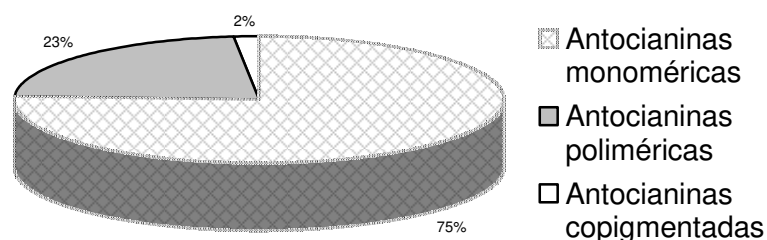


Figura 1. Distribuição de antocianinas em amora-preta.

O resultado obtido para antocianinas copigmentadas, $1,63 \pm 0,06 \%$, não foi representativo comparando com valores obtidos em vinho de uvas *Cabernet Franc*, *Merlot* e *Pinot Noir* (32,4 a 51,6 %), reportados por MAZZA *et al.* (27). No presente estudo a copigmentação foi induzida com acetaldeído, porém é um fenômeno que ocorre naturalmente no qual pigmentos e outros compostos orgânicos não coloridos formam associações ou complexos (15).

O perfil de antocianinas de amora-preta está apresentado na Figura 2. A identificação e características dos picos estão apresentadas na Tabela 2.

O espectro UV-visível do pico 1 mostrou $\lambda_{\text{máx}}$ a 519 nm, característica de derivados de cianidina ou peonidina (19), enquanto que o íon molecular $[M]^+$ a m/z 449 e espectro MS/MS com fragmento a m/z 287, corresponde a massa molecular da aglicona cianidina, como resultado da perda de uma hexose (162 nm), Tabela 2. A identificação do açúcar ligado à aglicona foi confirmado como sendo glucose por co-eluição com padrão de cianidina 3-glucosídeo.

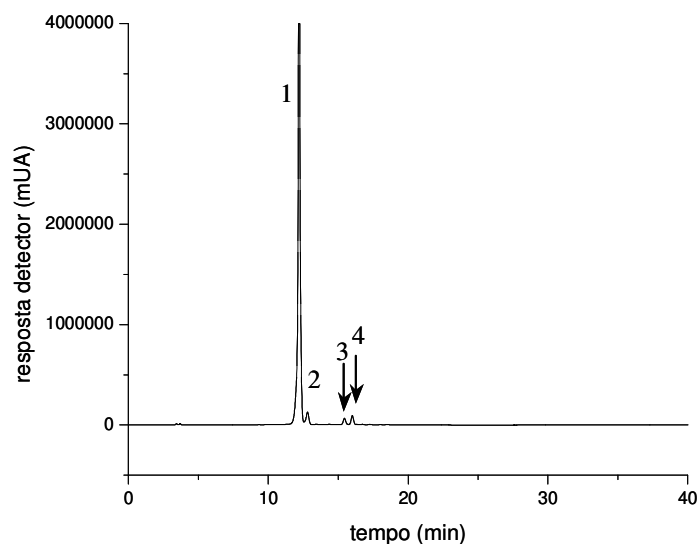


Figura 2. Cromatograma (processado a 520 nm), obtido por HPLC-PDA-MS/MS, do extrato antociânico de amora-preta. Pico 1: cianidina 3-glucosídeo, pico 2: cianidina 3-rutinosídeo, pico 3: cianidina 3-malonil-glucosídeo, pico 4: cianidina 3-dioxalil-glucosídeo. (Condições cromatográficas descritas no item 2.5.4).

A cianidina 3-rutinosídeo (pico 2) apresentou íon molecular a m/z 595 e dois fragmentos a 287 e 449 u, o primeiro fragmento correspondendo a aglicona cianidina, como resultado da perda de rutinose (308 u) e o fragmento a m/z 449 correspondendo a aglicona cianidina mais uma molécula de hexose, como o resultado da perda de uma desóxi-hexose $[M-146]^+$. O pico 2 foi definitivamente identificado como cianidina 3-rutinosídeo por co-eluição por HPLC com padrão.

Os picos 3 e 4 foram identificados como derivados da cianidina 3-glucosídeo, com diferentes ácidos. Considerando os espectros UV-visível e os íons moleculares, os picos 3 e 4, foram identificados como cianidina 3-malonil-glucosídeo e cianidina 3-dioxalil-glucosídeo, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Características cromatográficas, espectro UV-visível e espectrometria de massas de antocianinas de amora-preta obtidas por HPLC-PDA-MS/MS.

Pico ^a	t _R HPLC-PDA (min)	λ _{max} (nm) ^b	[M] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)	COMPOSTOS
1	12,2	280, 519	449	287[M-162]	Cianidina 3-glucosídeo
2	12,8	280, 522	595	449[M-146] 287[M-146-162]	Cianidina 3-rutinosídeo
3	15,4	280, 522	535	287[M-248]	Cianidina 3-malonil-glucosídeo
4	16,0	281, 523	593	287[M-306]	Cianidina 3-dioxalil-glucosídeo

^a Numerada de acordo com o cromatograma mostrado na Figura 2.

^b MP: metanol/5% ácido fórmico (v/v) de 85:15 a 20:80, mantendo esta proporção por 15 min.

Cianidina 3-glucosídeo (pico 1, Fig. 2) foi encontrada como a antocianina majoritária, representando 92,9 % da área total. O perfil de antocianinas encontrado neste estudo é compatível com os reportados na literatura para amora-preta (42, 48), onde cianidina 3-glucosídeo também é majoritária (88,6 a 95,2 %), com exceção de cianidina 3-xilosídeo (0,4 a 11,3 %) identificada por FAN-CHIANG & WROLSTAD (12), que não foi detectada no presente estudo.

O teor de carotenóides totais de amora-preta encontrado neste estudo (Tabela 1) foi 3 a 5 vezes menor que os teores reportados para outras frutas vermelhas, tais como ameixa, groselha preta, mirtilo, framboesa (18, 25), e principalmente menor em relação a frutas amarelas consideradas boa fonte de carotenóides, como manga e frutas da Amazônia (60 a 500 vezes) (30, 31). O perfil de carotenóides presente em amora-preta pode ser visualizado no cromatograma apresentado na Figura 3, e a identidade e características dos carotenóides separados estão apresentadas na Tabela 3.

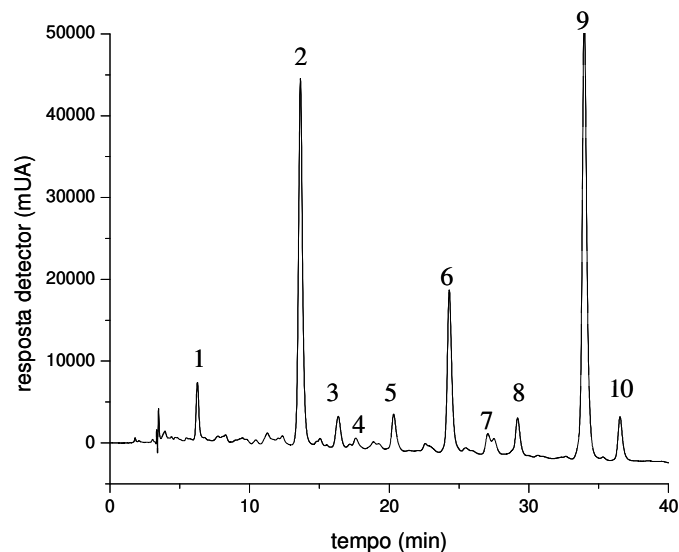


Figura 3. Cromatograma (processado a 450 nm), obtido por HPLC-PDA-MS/MS, de carotenóides de amora-preta. A identificação dos picos está apresentada na Tabela 3.

A identificação do pico 2 como *all-trans*-luteína foi realizada pelo espectro UV-visível característico, espectro de massas com a molécula protonada a m/z 569 e fragmentos devido à perda de grupos hidroxilas a m/z 551 $[M + H - 18]^+$ e 533 $[M + H - 18 - 18]^+$ (28, 29). Em adição, o MS/MS mostrou a presença do fragmento a m/z 477, resultante da perda de tolueno ($[M + H - 92]^+$) da cadeia poliênica e a m/z 459 devido à consecutiva perda da hidroxila e do tolueno. Uma característica da luteína foi o fragmento de 551 u com maior intensidade que o da molécula protonada (569 u), devido à presença de uma hidroxila alílica à ligação dupla no anel ϵ -. A co-eluição com padrão de *all-trans*-luteína confirmou a identificação do pico 2.

O pico 3 foi identificado como *all-trans*-zeaxantina considerando as características dos espectros UV-visível e de massas, e confirmado por co-eluição com padrão de *all-trans*-zeaxantina. Como esperado, o espectro de massas apresentou a molécula protonada em m/z 569 e fragmentos a m/z 551 $[M + H -$

18]⁺ e 533 [M + H – 18]⁺. A maior intensidade do pico da molécula protonada (569 u) comparada com o fragmento a *m/z* 551 indicou que o grupo hidroxila não era alílico à ligação dupla, em contraste ao observado para luteína.

O pico 4a foi identificado como 5,6-epóxi-β-criptoxantina considerando as características do espectro UV-visível, como $\lambda_{\text{máx}}$ 6 nm menor que a β-criptoxantina e estrutura fina maior. O espectro de massas apresentou molécula protonada a *m/z* 569 e fragmentos a *m/z* 551, devido à perda do grupo hidroxila, e a *m/z* 221, indicando que o epóxido está ligado ao anel β com o grupo hidroxila no carbono 3.

O pico 4b foi identificado como fitoeno, considerando os UV-visível ($\lambda_{\text{máx}}$ e estrutura fina) e de massas (6, 30). O espectro de massas apresentou a molécula protonada a *m/z* 545 e íon mais abundante a *m/z* 339 no espectro MS/MS, correspondendo à clivagem da ligação alílica próxima à conjugação dos trienos. Entretanto não foi possível identificar a isomeria, pois os espectros UV-visível e de massas para os isômeros *cis* e *all-trans* seriam idênticos. Cabe destacar que 15-*cis*-fitoeno é abundante em plantas verdes e na maioria dos microrganismos (6, 43), no entanto, a presença desta configuração em frutas não foi confirmada (10, 29, 30, 31)

Os picos 5 e 6 foram identificados como 13-*cis*- ou 13'-*cis*- e *all-trans*-β-criptoxantina, com espectros UV-visível similares ao de zeaxantina e β-caroteno, pois apresentam o mesmo cromóforo. Como esperado, para os isômeros *cis* e *trans*, a molécula protonada foi detectada a *m/z* 553, com fragmentos menos intensos a *m/z* 535 [M + H – 18]⁺ e 461 [M + H – 92]⁺, resultado da perda do grupo hidroxila e tolueno, respectivamente. A identificação foi confirmada por co-eluição com padrão *all-trans*-β-criptoxantina e, no caso do isômero *cis*, pela sua menor estrutura fina e presença do pico característico, além da ordem de eluição em coluna C₃₀ em relação ao isômero *all-trans* (10, 29).

Tabela 3. Características cromatográficas, dos espectros UV-visível e de massas de carotenóides de amora-preta obtidas por HPLC-PDA-MS/MS.

pico ^a	carotenóide	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	% III/II	% A _B /II	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)
1	n.d.	6,3	337, 408, 429, 449	n.c.	n.c.	n.d.	n.d.
2	all- <i>trans</i> - luteína	13,6	419, 444, 472	61	0	569	551[M+H-18], 533[M+H-18-18], 477[M+H-92], 459[M+H-18-92]
3	all- <i>trans</i> - zeaxantina	16,3	420, 450, 475	20	0	569	551[M+H-18], 533[M+H-18-18], 463[M+H-106]
4a	5,6-epoxy-β- criptoxantina	17,6	420, 445, 473	54	0	569	551[M+H-18], 533[M+H-18-18], 221
4b	fitoeno	17,6	276, 286, 300	0	0	545	489, 435, 395, 339[M- 205]
5	13- or 13'- <i>cis</i> - β-criptoxantina	20,3	339, 412, 443, 469	15	45	553	535[M+H-18], 495[M+H-56], 461[M+H-92]
6	all- <i>trans</i> -β- criptoxantina	24,3	420, 451, 477	25	0	553	535[M+H-18], 495[M+H-56], 461[M+H-92]
7	13- <i>cis</i> -β- caroteno	27,1	339, 420, 443, 471	14	44	537	444[M-92]
8	all- <i>trans</i> -α- caroteno	29,2	420, 445, 473	60	0	537	481[M+H-56], 444[M- 92]
9	all- <i>trans</i> -β- caroteno	34,0	425, 451, 478	25	0	537	444[M-92]
10	9- <i>cis</i> -β- caroteno	36,5	338, 420, 447, 472	20	19	537	444[M-92]

n.d., não detectado

^a Numerado de acordo com o cromatograma mostrado na Figura 3.

^b Eluição em coluna C30.

^c Gradiente linear Metanol/EMTB

Os picos 7, 9 e 10 foram identificados como *13-cis*-, *all-trans* e *9-cis*- β -caroteno, respectivamente (Tabela 3), considerando as características dos espectros UV-visível, o comportamento cromatográfico, co-eluição com padrões e espectros de massas. Os dois isômeros *cis* apresentaram menor estrutura fina e presença do pico *cis*. Todos os isômeros apresentaram a molécula protonada em m/z 537 e fragmento no MS/MS a m/z 444 $[M - 92]^+$, correspondendo à perda do tolueno da cadeia poliênica.

O pico 8 foi identificado como *all-trans*- α -caroteno apresentando o mesmo cromóforo que a luteína e, portanto, a absorção em espectro UV-visível se assemelhou a esta xantofila. A identificação foi confirmada através do comportamento cromatográfico, co-eluição com padrão de *all-trans*- α -caroteno, e espectro de massas. O espectro de massas apresentou a molécula protonada a m/z 537, e fragmentos a m/z 444, correspondendo à perda do tolueno, e a m/z 481, característica do α -caroteno.

Assim como reportado em outros estudos com frutas vermelhas (18, 25), os carotenóides majoritários encontrados em amora-preta foram *all-trans*- β -caroteno e *all-trans*-luteína, perfazendo 39,6 % e 28,2 % do total, respectivamente.

3.2. Atividade anti-radical livre de extratos de amora-preta

Os pigmentos antociânicos são conhecidos como efetivos seqüestradores de radicais livres e queladores de metais, e um grande número de investigações tem reportado uma alta correlação entre o conteúdo total de antocianinas e os valores de atividade antioxidante (21, 40, 49). Vários outros componentes fitoquímicos, como flavonóides, fenil-propanol e ácidos fenólicos, são também conhecidos por sua capacidade antioxidante em frutas e vegetais (45).

Neste estudo, a redução DPPH*, para as diferentes diluições do extrato de amora obtido com metanol 80%, atingiu o “platô” em torno de 30 minutos, como observado na Figura 4, e o valor obtido para EC₅₀ foi de $33,8 \pm 1,8$ g amostra/g DPPH e para AE foi de 0,030 (g DPPH /g amostra).

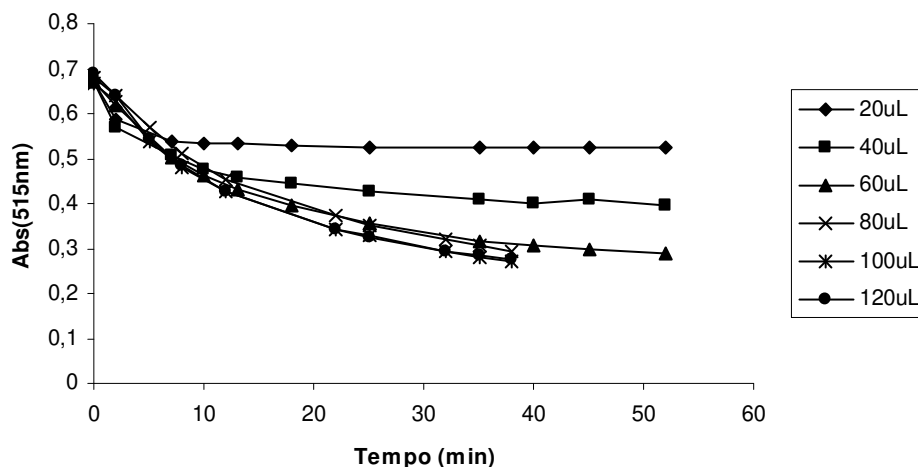


Figura 4. Curva de reação de diferentes concentrações de extrato de amora com DPPH em metanol.

O método ABTS foi utilizado com os extratos obtidos para os compostos fenólicos totais, antocianinas totais, monoméricas, poliméricas e copigmentadas, apresentando valores em uma faixa de 946,5 a 2209,6 mM/100 g de amora-preta (Tabela 4). Devido à correlação direta de compostos fenólicos e capacidade anti-radical livre (2, 22, 40), o extrato de compostos fenólicos apresentou a maior atividade anti-radical ABTS, enquanto que o extrato de antocianinas totais apresentou atividade antioxidante semelhante ao extrato de antocianinas monoméricas. Este resultado demonstra que as antocianinas monoméricas possuem papel fundamental como antioxidantes naturais em amora.

Tabela 4. Valores de TEAC encontrados em diferentes frações de amora-preta.

	<i>Distribuição em amora- preta (%)</i>	<i>TEAC (mM/100 g)^a</i>
Antocianinas monoméricas	75	1423,5 ± 153,4
Antocianinas poliméricas	23	946,5 ± 4,6
Antocianinas totais	100	1455,1 ± 116,2
Compostos fenólicos totais	-	2209,6 ± 68,4

^a Média e desvio-padrão de análise em duplicata.

Estes elevados teores de capacidade antioxidante aqui reportados ($2209,6 \pm 68,4$ mM/100 g; $33,8 \pm 1,8$ g amostra/g DPPH) foram apresentados previamente em diversos estudos com amora-preta (2, 16, 40, 46), onde foi avaliada a capacidade do extrato em seqüestrar radicais peróxidos, relativa ao padrão Trolox pelos métodos descritos neste estudo (frente aos radicais ABTS e DPPH), além do declínio por fluorescência (ORAC). Outros estudos demonstram a efetiva habilidade das amoras-pretas em inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, o que podem promover efeitos benéficos à saúde humana (17).

As antocianinas são os compostos fenólicos que possuem maior atividade antioxidante (44), devido à presença dos grupos hidroxilas no anel B (36). A cianidina 3-glucosídeo, a antocianina majoritária em amora-preta, contribuiu significativamente com a atividade antioxidante nestas frutas (47), também reportada por sua eficiência em prevenir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade em humanos, seguida das antocianidinas malvidina e pelargonidina conforme descrito por SATUÉ-GRACIA, HEINONEN & FRANKEL (37).

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a amora-preta é uma boa fonte de antocianinas comparada com outras frutas vermelhas como açaí (3), morango (46), framboesa (1) e a fruta tropical camu-camu (50), além do elevado teor de compostos fenólicos totais com atividade antioxidante, confirmando seu potencial como aditivo alimentício.

Agradecimentos: os autores agradecem a FAPESP.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANCOS, B., IBÁÑEZ, E., REGLERO, G., CANO, P. Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 873-879, 2000.

2. BENVENUTI, S.; PELLATI, F.; MELEGARI, M.; BERTELLI, D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. J. Food Sci., v. 69, p. 164-169, 2004.
3. BOBBIO, F. O., DRUZIAN, J. I., ABRÃO, P. A., FADELLI, S., BOBBIO, P. A. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açázeiro (*Euterpe oleracea Mart.*). Cienc. Tecnol. Aliment., v. 20, p. 388-390, 2000.
4. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm.-Wiss. Technol., v. 28, p. 25-30, 1995.
5. BRITTON, G. UV/visible Spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H (Ed.), Carotenoids: spectroscopy. Basel: Birkhauser, 1995, v. 1B, p. 13-62.
6. BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids Handbook; Birkhauser: Basel, Switzerland, 2004.
7. CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relations ships. Free Rad. Biol. Med., v. 22, p. 749-760, 1997.
8. CLIFFORD, M.N.; BROWN, J.E. Dietary flavonoids and health – broadening the perspective In: ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. (Ed.). Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. Taylor & Francis, Boca Raton. 2006, Cap. 6, p. 319-360.
9. CORDENUNSI, B. R., NASCIMENTO, J. R. O., GENOVESE, M. I., LAJOLO, F. M. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. J. Agric. Food Chem., v. 50, p. 2581-2586, 2002.

-
- 10.DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z.; HPLC-PDA-MS/MS of anthocuanins anda carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. J. Agric. Food Chem., v. 55, p. 9135-3141, 2007.
 - 11.DEGENHARDT, A., KNAPP, H., & WINTERHALTER, P. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. J. Agric. Food Chem., v. 48, p. 338-343, 2000.
 - 12.FAN-CHIANG, H. WROLSTAD, R.E. Anthocyanin pigment composition of blackberry. J. Food Sci., v. 70, p. 198-202, 2005.
 - 13.FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. *In*: MARKAKIS, P. Anthocyanins as food colors, London: Academic Press. 1982, p. 181-206.
 - 14.FULEKI, T., FRANCIS, F. J. Quantitative methods form anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanins in cranberries. J. Food Sci., v. 33, p. 72-77, 1968.
 - 15.GUTIÉRREZ, I.H. Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a sensible young red wine. J. Agric. Food Chem., v. 51, p. 4079-4083. 2003.
 - 16.HAGER, T.; HOWARD, L.R.; PRIOR, R.L. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. J. Agric. Food Chem., v. 56, p. 689-695, 2008.
 - 17.HEINONEN, M. I.; MEYER, A. S. & FRANKEL E. N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. J. Agric. Food Chem., v. 46, p. 4107-4112, 1998.
 - 18.HEINONEN, M.I.; OLLILAINEN, V.; KINKOLA, E.K.; VARO, P.T.; KOIVISTOINEN, P.E. Caretonoids in finnish foods: vegetables, fruits, and berries. J. Agric. Food Chem., v. 37, p. 655-659, 1989.

-
- 19.HONG, V.; WROLSTAD, R. E. Characterization of anthocyanin containing colorants and fruit juices by HPLC/Photodiode array detection. J. Agric. Food Chem., v. 38, p. 689-708, 1990.
 - 20.JURD, L.; ASEN, S. The formation of metal and "co-pigment" complexes of cyaniding 3-glucoside. Phytochem., v. 5, p. 1263-1271, 1966.
 - 21.KAPASAKALIDIS, P.G.; RASTALL, R.A.; GORDON, M.H. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. J. Agric. Food Chem., v. 54, p. 4016-4021, 2006.
 - 22.KIM, D. O., JEONG, S. W., LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chem., v. 81, p. 321-326, 2003.
 - 23.KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. Pure & Appl. Chem., v. 66, p. 1003-1010, 1994.
 - 24.LEE, J.; DURST, R.W.; WROLSTAD, R.E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. J. AOAC Internat., v. 88, p. 1269-1278, 2005.
 - 25.MARINOVA, D.; RIBAROVA, F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. J. Food Comp. Anal., v. 20, p. 370-374, 2007.
 - 26.MASCIO, P. D.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen desativador. Arch. Biochem, Biophys., v. 274, p. 532-538, 1989.
 - 27.MAZZA, G., FUKUMOTO, L., DEPAQUIS, P., GIRARD, B., EWERT, B. Anthocyanins, phenolics, and color of cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. J. Agric. Food Chem., v. 47, p. 4009-4017, 1999.

-
28. MELENDEZ-MARTINEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Identification of isolutein (lutein epoxide) as cis-antheraxanthin in orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 9369- 9373, 2005
29. MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Carotenoids from yellow fruit (*Passiflora edulis*). *J. Agric. Food Chem.*, v. 46, p. 4102-4106, 1998
30. MERCADANTE, A.Z., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; BRITTON, G. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, p. 120-123, 1997.
31. MERCADANTE, A.Z.; ROSSO, V.V.DE. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, p. 5062-5072, 2007.
32. METIVIER, R.P.; FRANCIS, F.J.; CLYDESDALE, F.M. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *J. Food Sci.*, v. 45, p. 1099-1100, 1980.
33. MÍNGUEZ-MOSQUETA, M.I.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods. *In: Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. Taylor & Francis, Boca Raton, 2002, Cap. 3.
34. PANTELIDIS, G.E.; VASILAKAKIS, M.; MANGANARIS, G.A.; DIAMANTIDIS, GR. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem.*, v. 102, p. 777-783, 2007.
35. RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Medic.*, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

-
36. RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAPAGANDA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 20, p. 933-956, 1996.
37. SATUÉ-GRACIA, M.T.; HEINONEN, I.M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3362-3367, 1997.
38. SCHWARZ, M.; HILLEBRAND, S.; HABBEN, S.; DEGENHARDT, A.; WINTERHALTER, P. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochem. Eng. J.*, v. 14, p. 179-189, 2003.
39. SEERAM, N., NAIR, M. Inhibition of lipid peroxidation and structure- activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 5308-5312, 2002.
40. SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 2432-2488, 2002.
41. SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A.Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American J. Enol. Viticult.*, v.16, p. 144-158, 1965.
42. STINTZING, F.C.; STINTZING, A.S.; CARLE, R.; FREI, B.; WROLSTAD, R.E. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 6172-6181, 2002.
43. TIZIANI, S.; SCHWARTZ, S. J.; VODOVOTZ, Y. Profiling of carotenoids in tomato juice by one- and two-dimensional NMR. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 6094-6100, 2006
44. WANG, H.; CAO, G. & PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, p. 304-309, 1997.

-
45. WANG, S.Y. Fruits with high antioxidant activity as functional foods. *In*: SHI, J. (Ed.) Functional food ingredients and nutraceuticals. Taylor & Francis, Boca Raton. 2007, Cap. 16, p. 371-398.
46. WANG, S.Y., LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 140-146, 2000.
47. WANG, S.Y.; BOWMAN, L.; DING, M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* spp) and promotes antiproliferations of human cancer cells. *Food Chem.*, v. 107, p. 1261-1269, 2008.
48. WU, X., PRIOR, R. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 2589-2599, 2005.
49. XU, R.; YAN, N.; CHEN, W.; LIU, L. Ultrasonic assisted extraction technology and its antioxidant activity of blackberry anthocyanin. *Nongye Gongcheng Xuebao/ Trans. Chin. Soc. Agric. Eng.*, v. 24, p. 264-269, 2008.
50. ZANATTA, C. F., CUEVAS, E., BOBBIO, F. O., WINTERHALTER, P., MERCADANTE, A. Z. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS and NMR. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 9531-9535, 2005.
51. ZHISHEN, J., MENGCHENG, T., & JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radical. *Food Chem.*, v. 64, p. 555-559, 1999.

CAPÍTULO III

ENCAPSULATION OF BLACKBERRY ANTHOCYANINS BY THERMAL GELIFICATION OF CURDLAN

Artigo em preparação para o periódico

Journal of Agricultural and Food Chemistry

ABSTRACT

Four cultivars of blackberry (*Rubus* spp.) were developed in Brazil, being cv. Tupy the most commercialized one. Blackberry fruits show an attractive colour and beneficial properties to human health due to the high content of anthocyanins. However, these pigments present poor stability, which difficult their use as food colorants. On the other hand, encapsulation techniques have been widely used in the food industry to protect food ingredients against degradation and/or premature interaction with other ingredients. Thus, the main objectives of this study were to encapsulate the blackberry anthocyanic extract by thermal gelification of curdlan, evaluate the effect of encapsulation process on the anthocyanin profile, as well as to determine some particle properties, such as size distribution, encapsulation efficiency and release curve. For the encapsulation process, the most suitable conditions were established as: curdlan-anthocyanin solution temperature of 40 °C; soy oil bath temperature of 80 °C; oil level at 6 cm; and height between oil bath and atomizer of 4 cm. The curdlan-anthocyanin particles were prepared using three different gum concentrations: 4.3, 5.1 and 5.6 %. The anthocyanin profile, measured by high-performance liquid chromatography connected to photodiode array and mass spectrometer detectors, was not affected by the encapsulation process. For all polymer concentrations, the particles showed spherical form and multinucleated appearance, with 83-88 % presenting diameter ranging from 0.3 to 0.8 μ m. Encapsulation efficiency ranged from 70 to 96.5 %, being the highest efficiency for the highest polysaccharide concentration. The release curves showed that the anthocyanins were completely released after 20 minutes in buffer solution (pH 1.0), independently of the curdlan concentration. For all gum concentrations, in the initial 60 minutes, the release curves followed first order kinetics, with k values ranging between 0.09 and 0.15 min⁻¹.

Key-words: anthocyanins; blackberry; thermal gelification; release curve; HPLC-PDA-MS/MS.

INTRODUCTION

The blackberry belongs to the ROSACEAE family, *Rubus* genus, and these fruits show attractive colour characteristics and beneficial properties, such as antioxidant activity due to the high content of anthocyanins (1,2,3,4). In Brazil, the first plants were introduced in 1972 by Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) in Rio Grande do Sul State, located in the South region. From foreign cultivars, mainly Brazos, Comanche and Cherokee, from the University of Arkansas State (United States), Embrapa developed cultivars adapted to the Brazilian climatic conditions and consumers demand, such as cultivar Ébano introduced in 1981, and afterwards cultivars Negrita (1983), Tupy and Guarani (1988), and Caingangue (1992) were developed. Currently in Brazil, the most commercialized cultivar is Tupy one, followed by cultivars Guarani and Brazos, all being hybrid species (5,6).

Independently of the cultivar or country, the major anthocyanins found in the blackberry (*Rubus* spp.) were the cyanidin 3-glucoside (77.0 – 92.8 %), cyanidin 3-rutinoside (0.6 – 4.6%), cyanidin 3-xyloside (0.3 – 7.7 %), cyanidin 3-malonyl-glucoside (1.5 – 3.9 %), and cyanidin 3-dioxalyl-glucoside (1.5 – 14.9 %) (7,8). On the other hand, Wu & Prior (9) also identified these five anthocyanins in blackberry from not identified cultivars from United States, along with other three different anthocyanins, cyanidin 3-arabinoside, pelargonidin 3-glucoside, and peonidin 3-glucoside.

These anthocyanin structures are illustrated in Figure 1.

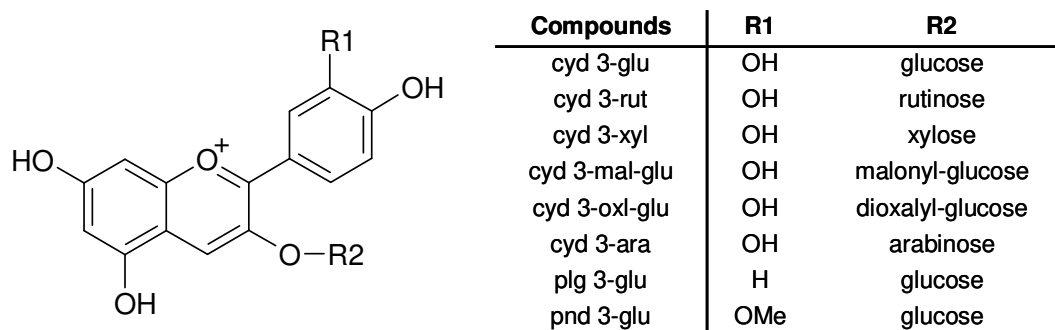


Figure 1. Chemical structures of blackberry anthocyanins.

In addition, the anthocyanin contents of blackberry fruits, expressed as cyanidin 3-glucoside, ranged from 67.4 to 248.0 mg/100 g in 19 cultivars from several countries in North and South America and Europe (7,10,11,12,13).

Anthocyanins would be the ideal substitutes for synthetic red colorants because of their bright colors varying from red to blue, water solubility and non-toxicity. Nevertheless, the use of these pigments in foods has been hampered by their poor stability that is affected by physical and chemical factors as temperature, pH, light, solvent and the structure of the pigment itself as well factors prevailing during food processing and storage (14). In fact, the cation flavylium, the colored anthocyanin form, is only predominant at low pH values (15).

In order to overcome the poor anthocyanin stability, microencapsulation can be an interesting alternative. Microencapsulation is a packing technique in which thin polymeric layers are deposited in solids, liquid droplets or gaseous material, making small particles called microcapsules (16,17). The microcapsules are composed by a polymer, as wall material, and an active material called core, which can be food additives, drugs or other materials (18). Besides making easier to handle the interesting compound, the objective of the microencapsulation is to protect core material against ambient adverse conditions, such as light, humidity, oxygen and interactions with other compounds. This process increases the shelf life and stabilizes the product, allowing the controlled release of the encapsulated compound in predetermined conditions (19).

Xiong *et al.* (20) encapsulated commercial black currant extract by thermal gelification of a glucan obtained from barley. The capsules were dried by four different methods and the anthocyanin recovery was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The anthocyanin recovery showed differences among the different drying methods, being higher for freeze drying, with 83-84 % of recovery, as compared to the other techniques (vacuum oven, conventional oven and infrared drying), that ranged from 58 to 79 % of recovery. The authors attributed the recovery differences to different degradation degree of anthocyanins during the encapsulation and drying processes. The authors

concluded that the anthocyanin encapsulation with natural polymers may be a useful encapsulation technique for efficient applications of this pigment in food systems.

Considering the blackberry extract potentialities, the objectives of this study were: evaluate the gelification of different polysaccharides at low pH values, to encapsulate the blackberry anthocyanic extract by thermal gelification using curdlan (the best tested polysaccharide stable at pH ~ 2.0), evaluate the effect of the gelification process on the anthocyanin profile, characterize the particles, and determine the anthocyanin release profile.

MATERIAL AND METHODS

Materials. The following polysaccharides were used: sodium alginate from Manugel DMB, San Diego, USA (high molecular weight, high guluronate group content), batch 500771 and ref. 669990; citric pectin with low methoxylation degree (LMP) of 26-30 %, type 8002/R with degree of amidation of 15-21 %, batch 11655 and ref. 11.9900 (Citrus Colloids S/A, donated by Ind. Braspectin S.A., Limeira, Brazil); and curdlan gum (ref. 54724-00-4), moisture content no more than 10 % (60 °C, vacuum, 5 hours) donated by Takeda Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan).

Frozen blackberry fruits (*Rubus* spp.), 8 kg, Tupy cultivar, were acquired from DeMarchi (Jundiaí, Brazil) in November of 2007.

Standards of cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-galactoside, cyanidin 3-rutinoside, cyanidin 3,5-diglucoside, cyanidin 3-rhamnoside, pelargonidin 3-glucoside, peonidin 3-glucoside, cyanidin and pelargonidin were obtained from Extrasynthèse (Genay, France)

Preparation of the anthocyanin extract. The anthocyanin extract was obtained from 400 g of the homogenized frozen blackberries. The extraction was carried out by agitation provided by a homogenizer (Metabo, Nürtingen, Germany) with methanolic solution containing HCl 1 % (21). The extract was concentrated

until methanol evaporation in a rotary evaporator ($T < 38\text{ }^{\circ}\text{C}$) and this concentrated crude anthocyanin extract was kept at $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ until particle preparation.

Production of curdlan particles containing blackberry anthocyanic extract. In order to define the best encapsulant at the highest stability conditions for anthocyanins, e.g. aqueous solution at $\text{pH} < 2.5$, three polysaccharides at three different concentrations were tested for encapsulation. Alginate, pectin (LMP) and curdlan were used at 2, 5 and 6 % (w/v) concentrations in aqueous solutions of citric acid at pH values of 1.5, 2.0 and 2.5.

The encapsulation process to evaluated the variables were: three different concentrations of curdlan aqueous solutions (5, 6 and 6.5 % (w/v)), curdlan-anthocyanin solution, at temperatures of 35, 40 and 45 $^{\circ}\text{C}$; oil bath temperature of 70, 80 and 90 $^{\circ}\text{C}$; oil level at 5 and 6 cm; and height between oil bath and atomizer of 4, 5 and 11 cm. After these initial tests, 5 mL of the concentrated crude anthocyanin extract were added to the curdlan solutions, resulting in polysaccharide final concentrations of 4.3, 5.1 and 5.6 % (w/v). The curdlan-anthocyanin solution was sprayed into the soybean oil bath, which was under constant temperature and slow agitation, using a double fluid atomizer at 40 $^{\circ}\text{C}$ and air pressure of 0.05 kgf/cm^2 . The particles were recovered by filtration under vacuum, and then, they were washed once with chloroform; the residue was removed using nitrogen.

Immediately after particles preparation, moisture, anthocyanin content, capsule morphology and core release were evaluated. All analyses were carried out in triplicate. In addition, the effect of encapsulation by gelification on the anthocyanin profile was evaluated by high performance liquid chromatography connected to diode array and mass spectrometer detectors (HPLC-PDA-MS).

Analysis of anthocyanins by HPLC-PDA-MS/MS. The concentrated crude extract (15 g) was submitted to open column chromatography on XAD-7 before the HPLC-PDA-MS/MS analysis in order to remove sugars (22,23). The partially purified extract was diluted in 5 % formic acid/methanol (85:15) immediately before

analysis by HPLC-PDA-MS/MS. The extract was analyzed on a Shimadzu (Kyoto, Japan) HPLC, equipped with quaternary pumps (model LC-20AD), on line degasser and a Rheodyne injection valve with 20 μ L loop, connected in series to a PDA detector (Shimadzu, model SPD-M20A) and a mass spectrometer with an ion-trap analyzer from Bruker Daltonics (model Esquire 4000, Bremen, Germany). After passing through the flow cell of the PDA, the column eluate was split allowing only 0.15 mL/min into the electrospray ionization (ESI) interface. The UV-visible spectra were obtained between 250 and 600 nm and the chromatograms were processed at 280 and 520 nm. The anthocyanins were separated as previously described (24), on a 250 x 4.6 i.d. mm, 5 μ m particle size, C₁₈ Shim-pack CLC-ODS column (Shimadzu, Canby, Oregon), using as mobile phase a linear gradient of 5 % formic acid/methanol (v/v) from 85:15 to 20:80 in 25 min, the latter proportion being maintained for further 15 min, at a flow rate of 0.9 mL/min and column temperature set at 26 °C. The MS/MS parameters were set as follows: positive mode, capillary voltage: 2500 V, end plate offset: 2000 V, capillary exit: 110 V, skimmer 1: 20 V, skimmer 2: 10 V, dry gas (N₂) temperature: 325 °C and flow: 11 L/min, nebulizer: 30 psi, scan range from *m/z* 100 to 800. MS/MS was set in automatic mode applying fragmentation energy of 1.2 V. The anthocyanins were identified based on the combined information provided by elution order in the reversed phase column, co-chromatography with standards, UV-visible and mass spectra characteristics compared to the literature data (9,22,25).

Characterization of particles. For moisture determination, 3 g of moist particles were weighed in three Petri plates and these plates were kept into an oven at 60 °C until constant weight.

The extraction of surface anthocyanins from the particles was carried out by washing with methanolic solution of 1 % HCl, whereas the total anthocyanins were obtained by particle maceration with the same solvent. Quantification was carried out by the differential pH method (26), using an Agilent 8453 spectrophotometer, and the results were expressed as cyanidin 3-glucoside.

Encapsulation efficiency was calculated according to equation 1 (27), using the results from total and surface anthocyanin contents.

$$\%EE = \frac{(TAC - SAC)}{TAC} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Where: %EE = encapsulation efficiency

TAC = total anthocyanin content

SAC = surface anthocyanin content

A CITOVAL2-ZEISS optical stereo-microscope was used to observe the general morphology of the particles, using objectives from 1.5 x to 3.5 x. The images were registered and saved by the Global Lab Image software. Using the microscope images, the size distribution and mean size were calculated by measuring 100 to 300 particles.

Determination of the release curves. Glass tubes were prepared with 1 g of particles and 10 mL of 0.025 M potassium chloride buffer solution at pH 1.0, and were submitted to constant shaking at 22 rpm in a rotary tubes shaker (blood homogenizer model AP22, Phoenix, Araraquara, Brazil) under dark. The anthocyanin release was monitored by measuring absorbance at 510 nm each 10 min until complete 3 h. Individual tubes were prepared for each time. In order to induce total core release, particles were macerated using buffer solution pH 1.0.

Released anthocyanin contents were calculated according to Beer Law (equation 2), using the major anthocyanin (cyanidin 3-glucoside) absorptivity of 26900 L.mol⁻¹.cm⁻¹ in buffer solution at pH 1.0 (28).

$$C = \frac{A \times DF}{\epsilon \times l} \quad (\text{Eq. 2})$$

Where: C = anthocyanin concentration (μM)

A = absorbance at 510 nm

DF = dilution factor

l = optical length (cm)

ϵ = molar absorptivity ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

RESULTS AND DISCUSSION

Particle preparation. For all concentrations, at pH values of 1.5 and 2.0, both pectin and alginate precipitated due to the hydrolysis of these polysaccharides (29). At pH 2.5, both pectin and alginate formed a weak gel and promoted an increase in the pH value, which would result in changing on the anthocyanins conformation (15). In fact, when 5 and 6 % of polysaccharide (both pectin and alginate) were used a higher temperature ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$) was necessary in order to obtain the complete dissolution of the gums, and this high temperature can cause anthocyanin degradation (30).

On the other hand, for all curdlan concentrations, at all pH values (1.5 to 2.5), this polysaccharide dissolved in water at the expected temperature of $\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, as well as formed gel at $\sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, as previously reported (31). However, with 2 % of curdlan, the gel formed was weak and, thus, not suitable for capsules preparation.

After the visual analysis of the polysaccharides gelling power, the chosen wall material was curdlan, because this polymer did not lose gelling capacity (was able to form a strong/hard gel) at pH lower than 2.

The variation on the thermal gelification process conditions was carried out in order to obtain curdlan-anthocyanin particles with good physical characteristics, such as size distribution and morphology, as well as, to minimize losses of either

core or wall material, during the process. In this way, some suitable conditions for curdlan-anthocyanin particles preparation, using different curdlan concentrations, were established and are shown on Table 1.

Table 1. Conditions used for thermal gelification of curdlan.

Parameter	Defined value
Temperature of curdlan-anthocyanin solution	40 °C
Temperature of oil bath	80 °C
Level of oil bath	5 cm
Height from atomizer to oil bath	4 cm

For the oil bath and curdlan-anthocyanin solution, when higher temperatures, 90 °C and 45 °C, respectively, were used in the encapsulation process, the anthocyanins lost their characteristic colour due to pigment degradation, while when lower oil bath temperature (70 °C) was applied, the curdlan did not form the stable and thermo-irreversible gel, the so called high-set gel (32), which is required in order to obtain particles with good physical characteristics.

Both the level of oil bath and the height from atomizer to oil bath were established in order to minimize the losses of formed particles. It is important to note that these parameters values have strong influence on the particle size features.

Effect of the gelification process on the anthocyanin profile. According to the chromatograms shown in Figure 2 and data from Table 2, the encapsulation process did not change the anthocyanin profile from the blackberry extracts before and after this process.

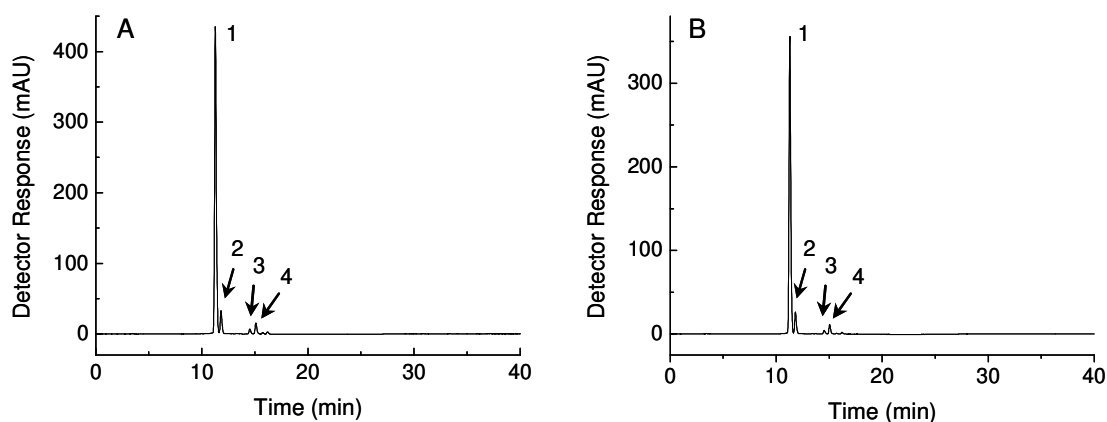


Figure 2. Anthocyanin profiles (A) before and (B) after the encapsulation process. Chromatographic conditions: see text. Both processed at 520 nm. The peak identification is given in Table 2.

Table 2 Chromatographic, UV-Vis and mass spectrometry characteristics of anthocyanins from blackberry, and percentage before and after encapsulation, obtained by HPLC-PDA-MS/MS

Peak ^a	Compounds	t_R (min)	λ_{max}^b (nm)	MS/MS (m/z)	% ^c	
					before	after
1	Cyanidin 3-glucoside	11.3	280, 519	449[M] ⁺ , 287[M-162] ⁺	88.6	90.0
2	Cyanidin 3-rutinoside	11.8	280, 521	595[M] ⁺ , 449[M-146] ⁺ , 287[M-146-162] ⁺	6.7	6.4
3	Cyanidin 3-malonyl-glucoside	14.5	280, 522	535[M] ⁺ , 287[M-248] ⁺	1.5	0.9
4	Cyanidin 3-dioxalyl-glucoside	15.1	280, 523	593[M] ⁺ , 287[M-306] ⁺	3.2	2.7

^a Numbered according to Figure 2. ^b Linear gradient of 5 % formic acid/methanol. ^c Percentage of each peak area in relation to the total area.

Peaks 1 to 4 were identified according to their UV-Vis and MS features, by comparing to the literature (9,22,25). Cyanidin 3-glucoside (peak 1) showed the

molecular ion ($[M]^+$) at m/z 449 and the MS/MS fragment at m/z 287, which corresponded to the cyanidin moiety, resulting from the loss of a hexose. Cyanidin 3-rutinoside (peak 2) showed the $[M]^+$ at m/z 595 and two mass fragments with 287 and 449 u, the first one corresponded to the cyanidin moiety, as a result of the loss of rutinose (308 u) and the fragment at m/z 449 resulted from the loss of a deoxyhexose $[M-146]^+$. Different from other disaccharides, where the ionization did not cleave the glucosyl linkage between the sugar unities, the 1,6-glucosyl linkage between the rhamnose and the glucose moieties allowed free rotation and more accessibility to the gas used to produce fragmentation (33). This fragmentation pattern was already reported by De Rosso & Mercadante (22) and Wu & Prior (9). The identification of both cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-rutinoside was confirmed by co-elution with standards.

The acylated anthocyanins (peaks 3 and 4) were tentatively identified as 3-malonyl-glucoside and 3-dioxalyl-glucoside of cyanidin, respectively, by comparing the UV-Vis and MS characteristics found in this study to that reported in other studies, which identified these anthocyanins in blackberry extracts (7,9,34).

Characterization of curdlan-anthocyanin particles. All particles obtained with different curdlan concentrations (4.3, 5.1 and 5.6 %) showed spherical form and multinucleated appearance (Figure 3). This multinuclear aspect is most probably due to hydrophobic interactions between the curdlan and soybean oil during the gum gelification under high temperature (31,35). Spherical form and multinucleated appearance was also reported by Mukai-Correa *et al.* (36) in a study involving casein microcapsules prepared by ionic gelification of gellan gum, pectin, alginate and a ternary mixture of these polysaccharides.

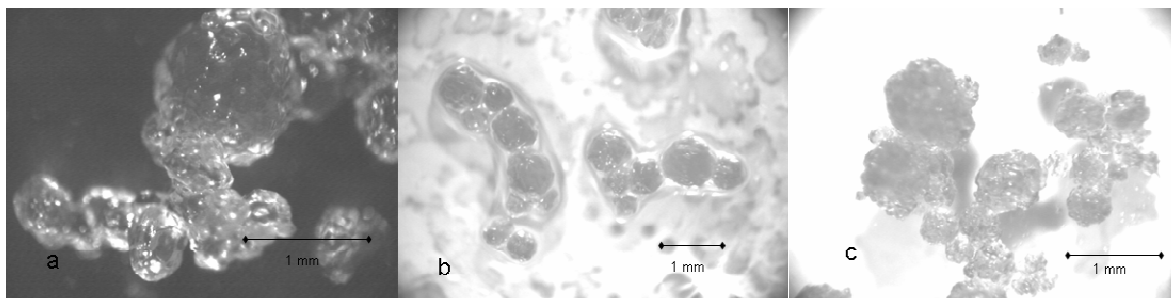


Figure 3. Stereo-microscope images obtained from curdlan-anthocyanin particles made with (a) 4.3 % (objective 3.2x), (b) 5.1 % (objective 1.6x) and (c) 5.6 % (objective 2.0x) of curdlan.

The use of different objectives to register the particle images by stereo-microscope (Figure 3) allowed the visualization of the rough wall, possible agglomerates and allowed the size distribution determination, which is shown on Figure 4.

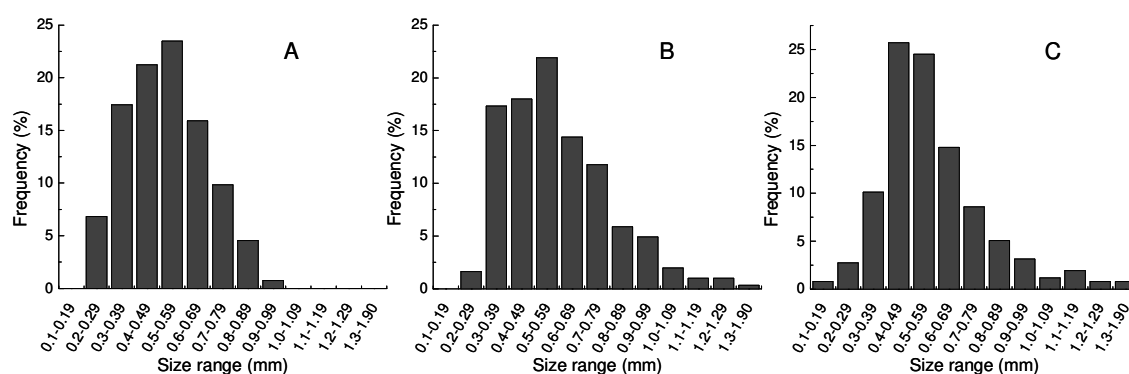


Figure 4. Size distribution of curdlan-anthocyanin particles made with (A) 4.3 % (w/v), (B) 5.1 % (w/v) and (C) 5.6 % (w/v) of curdlan.

The variation of gum concentrations, within the range applied in this study, used in the encapsulation process, had little effect on the size characteristics of curdlan-anthocyanin particles. As shown in Figure 4, for all polymer concentrations,

most particles (between 83 % and 88 %) showed diameter ranging from 0.3 to 0.8 mm. In the same way, the particles mean size (Table 3) showed similar values for all curdlan concentrations, being this result influenced by the fact that all the other process conditions were kept constant, such as air pressure, temperature, atomizer height, atomizer diameter and feed flow of polymeric solution. The size distribution profiles (Figure 4) obtained from all curdlan-anthocyanin particles showed similar appearance as compared to those found by Mukai-Correa *et al.* (36) for casein microcapsules obtained by ionic gelification.

On the other hand, the particles prepared with 5.6 % of curdlan showed more uniform particle size than the other capsules, since 50 % of these particles were in the diameter range of 0.4-0.6 mm (Figure 4C). This size uniformity for the 5.6 % curdlan particles was accompanied by higher encapsulation efficiency than those obtained with lower amounts of curdlan (Table 3). This result is coherent, since, according to Funami *et al.* (32), with higher polysaccharide content, the transition state from thermo-reversible to thermo-irreversible gel is faster, due to strong hydrophobic interactions. This faster transition probably increases the anthocyanin quantity retained into particles as compared to the surface anthocyanin content.

Table 3. Characteristics of curdlan-anthocyanins particles.

Particles ^a	Moisture ^b (%)	Mean size ^b (mm)	EE ^{bc} (%)
4.3 % _{w/v}	66.65 ± 1.38	0.52 ± 0.16	80.26 ± 0.05
5.1 % _{w/v}	78.70 ± 1.40	0.59 ± 0.21	95.23 ± 0.16
5.6 % _{w/v}	83.34 ± 0.68	0.58 ± 0.22	96.68 ± 0.18

^a particles classified according to the curdlan final concentration in solution

^b average and standard deviation of triplicate analysis

^c EE: encapsulation efficiency calculated according to equation 1

The moisture of the particles increased, as curdlan concentration increased. This result is in agreement with the fact that the highest water retention capacity of

curdlan gel occur at gelification temperatures higher than 50-60 °C, and the water necessity is proportional to the quantity of associated polysaccharide chains (32).

Release curves. Figure 5 shows the release profiles of curdlan-anthocyanin particles, formed with 4.3, 5.1 and 5.6 % of curdlan, and the fit curves obtained for kinetic considerations.

As observed in the release profiles, the anthocyanins were completely released after 20 minutes, independently of the curdlan concentration showing one strong burst effect. This fact was not expected since the increase in curdlan concentration promotes an increasing on gel strength (32,35). Most probably, the fast release is favored by the high anthocyanin solubility into the acid aqueous medium, as well as the large quantity of water entrapped into particles makes easier the active compound diffusion. In fact, the active material (anthocyanins) is water dissolved and homogeneously distributed into micelles of gel, which are formed by triple-stranded or multiple helix chains (35). That is, these both characteristics – homogeneous distribution of anthocyanins and large water quantity entrapped into micelles of gel – allowed a fast diffusion of anthocyanin molecules among the polysaccharide chains, resulting in a fast liberation.

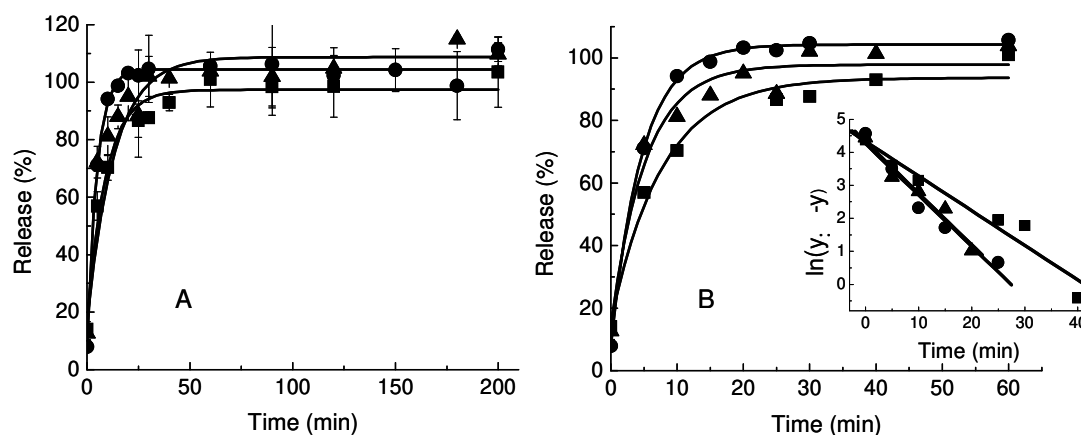


Figure 5. Release curves obtained from curdlan-anthocyanin particles made with (■) 4.3 %, (●) 5.1 % e (▲) 5.6 % of curdlan. (A) Total time of release assay; (B) first 60 minutes of release assay, inset: linear fit for $\ln(y_{\infty} - y)$ vs. time

Since after 20 minutes the anthocyanins were completely released, for kinetic considerations the release curves were adjusted to first order exponential kinetic (according to equation 3) using the initial points of release (from 0 to 60 minutes; Figure 5B). The first order behavior of these release curves were confirmed by the linear graphics for plot of $\ln(y_{\infty} - y)$ vs. time, shown in the inset of Figure 5B, with high R^2 values, 94.7, 95.9 and 96.3 % for curdlan-anthocyanin particles made with 4.3, 5.1 and 5.9 % of curdlan, respectively. Thus, these values indicate that the first order exponential kinetic represented a good adjustment for the release profiles of curdlan-anthocyanin particles obtained in this study. The parameters from the first order exponential adjusts are shown in Table 4.

$$y = y_{\infty} + A \cdot e^{-x/t} \quad (\text{Eq. 3})$$

Where: y = percent of release

y_{∞} = percent of release at infinite time

$A = y_0 - y_{\infty}$

y_0 = percent of release at initial time

x = time

t = half-life time

Table 4. First order exponential parameters from release curves of anthocyanin particles obtained with different curdlan concentrations.

	4.3 %	5.1 %	5.6 %
y_{∞}^a	93.6 ± 3.1	104.3 ± 0.7	97.8 ± 2.9
A^a	-78.0 ± 5.8	-96.4 ± 1.4	-83.7 ± 6.6
t^a (min)	7.8 ± 1.4	4.7 ± 0.2	5.2 ± 1.0
R^2 (%)	97.9	99.9	96.4
k (min^{-1})	0.09	0.15	0.13

^a values are average $\pm$ standard deviation.

The k values represent, in this study, the rate constant of anthocyanin diffusion from particles to bulk solution and indicated that the diffusion rates were similar for all particles. This result is in agreement with the similar release profiles shown by particles (Figure 5).

The fast release of anthocyanins from the particles denoted that the crosslink three-dimensional net formed by triple-stranded or multiple helix chains in curdlan gelification was not narrow enough to obtain anthocyanin controlled release. However, in another work carried out in order to obtain curdlan jelly (by thermal gelification) containing theophylline (35), which is a small hydrophilic molecule as anthocyanins, the authors reported a different release pattern. In this work, the amount of released drug was proportional to the square-root of time. It is important to note that the methods used by these authors for the preparation of curdlan jelly and release assay were different from the methods used in the present study. In addition, there is an important structural difference among anthocyanin and theophylline, that is, the first one is a charged molecule, which do not happen with theophylline. This structural feature presented by anthocyanins could have some effect on this pigment diffusion among the curdlan chains in the gel.

On the other hand, Kim *et al.* (37) entrapped bovine serum albumin (MW = 66600) in curdlan gel by gelification in urea solution at 37 °C, and evaluated the release of both protein and urea, which was entrapped together with the protein during the gelification process. In this study, the urea (MW = 60) was almost released after 2 h and its release profile was similar to those anthocyanin release patterns obtained in the present work. The protein release also showed a similar profile, but the release rate of this compound was much slower as compared to that of urea release. In fact, the protein was completely released after 45-100 h.

As far as we are concerned, the only study about anthocyanin encapsulation by using gelification technique is the work of Xiong *et al.* (20). However, in this study, the anthocyanins were encapsulated in other glucan (not curdlan) gel, and the only capsule characteristic evaluated by the authors was anthocyanin recovery.

This fact becomes difficult the comparison of results, since in the present study other particle characteristics were evaluated. In addition, other encapsulation techniques, such as spray drying, for example, which was already used for anthocyanin microencapsulation (38,39), provide capsules with very different characteristics.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Brazilian Funding Agencies FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for their financial support.

REFERENCES

- (1) Antunes, L. E. C. Amora-preta: Nova opção de cultivo no Brasil. *Ciência Rural* **2002**, 32, 151-158.
- (2) Dai, J.; Patel, J. D.; Mumper, R. J. Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties. *J. Med. Food* **2007**, 10, 258-265.
- (3) Seeram, N. P.; Adams, L. S.; Zhang, Y.; Lee, R.; Sand, D.; Scheuller, H. S.; Heber, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 9329-9339.
- (4) Wang, S. Y.; Lin, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 140-146.

-
- (5) Martins, F. P.; Junior, M. J. P. Influência do espaçamento na produtividade da amora-preta cv. Ébano em Jundiaí. *Bragantia* **1999**, *58*, ISSN 0006-8705.
- (6) www.cpact.embrapa.br, accessed in November of 2006.
- (7) Fan-Chiang, H.; Wrolstad, R. E. Anthocyanin pigment composition of blackberry. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, 198-202.
- (8) Stintzing, F.C.; Stintzing, A.S.; Carle, R.; Frei, B.; Wrolstad, R.E. Color and antioxidant properties of cyaniding-based anthocyanin pigments. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6172-6181.
- (9) Wu, X.; Prior, R. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2589-2599.
- (10) Benvenuti, S.; Pellati, F.; Melegari, M.; Bertelli, D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, 164-169.
- (11) Pantelidis, G.E.; Vasilakakis, M.; Manganaris, G.A.; Diamantidis, Gr. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem.* **2007**, *102*, 777-783.
- (12) Sellappan, S.; Akoh, C.C.; Krewer, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2432-2488.
- (13) Hager, T.J.; Howard, L.R.; Prior, R.L. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 689-695.

-
- (14) Mercadante, A. Z.; Bobbio, F. O. Anthocyanins in foods: occurrence and physicochemical properties. In *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*; Socaciu, C., Ed.; CRC Press: Boca Raton, **2008**; p 241-276.
- (15) Houbiers, C.; Lima, J. C.; Macüanita, A. L.; Santos, H. Color stabilization of malvidin 3-glucoside: self-aggregation of the flavylum cation and copigmentation with the Z-chalcone form. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3578-3585.
- (16) Peterson, M. S.; Johnston, A. M. Microencapsulation. In *Encyclopedia of Food Science*; AVI Publishing Co.: Westport, **1978**; p 499-507.
- (17) Tood, R. D. Microencapsulation and flavour industry. *Flavour Ind.* **1970**, *1*, 768-771.
- (18) Arshady, R. Microcapsules for food. *J. Microencapsul.* **1993**, *10*, 413-435.
- (19) Shahidi, F.; Han, X. Encapsulation of food ingredients. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1993**, *33*, 501-547.
- (20) Xiong, S.; Melton, L. D.; Easteal, A.; Siew, D. Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucan gel. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6201-6208.
- (21) Francis, F. J. Analysis of anthocyanins. In *Anthocyanins as food colors*; Markakis, P., Ed.; Academic Press: London, 1982; p 181-206.
- (22) De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9135-9141.
- (23) Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 338-343.

-
- (24) De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola. *Food Chem.* **2007**, *103*, 935-943.
- (25) De Rosso, V.V.; Hillebrand, S.; Montilla, E. C.; Bobbio, F. O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A. Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21*, 291-299.
- (26) Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1269-1278.
- (27) Mcnamee, B. F.; O'riordan, E. D.; O'sullivan, M. Effect of partial replacement of gum arabic with carbohydrates on its microencapsulation properties. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3385-3388.
- (28) Jurd, L.; Asen, S. The formation of metal and "co-pigment" complexes of cyaniding 3-glucoside. *Phytochemistry* **1966**, *5*, 1263-1271.
- (29) Gombotz, W.R.; Wee, S.F.; Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *31*, 267-285.
- (30) Wang, W.D.; Xu, S.Y. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *J. Food Eng.* **2007**, *82*, 271-275.
- (31) Ikeda, S.; Shishido, Y. Atomic force microscopy studies on heat-induced gelation of curdlan. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 786-791.
- (32) Funami, T.; Funami, M.; Yada, H.; Nakao, Y. Rheological and thermal studies on gelling characteristics of curdlan. *Food Hydrocolloids* **1999**, *13*, 317-324.

-
- (33) Giusti, M. M.; Rodríguez-Saona, L. E.; Griffin, D.; Wrolstad, R. E. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4657-4664.
- (34) Stintzing, F. C.; Stintzing, A. S.; Carle, R.; Wrolstad, R. E. A novel zwitterionic anthocyanin from evergreen blackberry (*Rubus laciniatus* Willd.). *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 396-399.
- (35) Hino, T.; Ishimoto, H.; Shimabayashi, S. Thermal gelation of aqueous curdlan suspension: preparation of curdlan jelly. *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**, *55*, 435-441.
- (36) Mukai-Correa, R.; Prata, A. S.; Alvim I. D.; Grosso, C. R. F. Controlled release of protein microencapsulated by ionic gelation. *Curr. Drug Deliv.* **2007**, *1*, 265-273.
- (37) Kim, B. S.; Jung, I. D.; Kim, J. S.; Lee, J.; Lee, I. Y.; Lee, K. B. Curdlan gels as protein drug delivery vehicles. *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 1127-1130.
- (38) Ersus, S.; Yurdagel, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray dryer. *J. Food Eng.* **2007**, *80*, 805-812.
- (39) Tonon, R. V.; Brabet, C.; Hubinger, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *J. Food Eng.* **2008**, *88*, 411-418.

CONCLUSÃO GERAL

A amora-preta do gênero *Rubus* spp., cultivar Tupy, apresentou $241,7 \pm 0,8$ mg GAE/100 g de compostos fenólicos totais e $173,7 \pm 0,7$ mg CE/100 g de flavonóides totais. De acordo com o aumento do teor de antocianinas presentes no extrato (monoméricas, poliméricas e totais), aumentou também o valor de TEAC. No entanto, pode-se concluir que estes compostos presentes na amora-preta foram os principais responsáveis pela elevada capacidade antioxidante avaliada pela habilidade de capturar radicais livres ABTS (TEAC $2209,7 \pm 68,4$ mM/100 g) e DPPH (EC₅₀ $33,8 \pm 1,8$ g amostra/g DPPH).

Na amora-preta *in natura*, foram encontradas principalmente antocianinas monoméricas ($104,1 \pm 1,8$ mg/100 g), perfazendo $76,2 \pm 0,3$ % do total de antocianinas presentes. As antocianinas poliméricas ($22,8 \pm 0,4$ %) e copigmentadas ($1,6 \pm 0,1$ %) estão presentes em menor quantidade na amora fresca, diferentemente do que ocorre em sucos de amora e vinhos, após processamento e armazenamento.

O perfil antociânico avaliado para amora-preta por HPLC-PDA-MS/MS apresentou a cianidina 3-glucosídeo como majoritária (92,9 %). Outras 3 antocianinas foram identificadas: cianidina 3-rutinosídeo (3,5 %), cianidina 3-dioxalil-glucosídeo (2,1 %) e cianidina 3-malonil-glucosídeo (1,5 %).

As amoras-pretas podem ser consideradas frutas com baixo teor de carotenóides ($86,5 \pm 0,1$ µg/100 g), em relação a outras frutas onde predomina a coloração amarela do β-caroteno. Foram identificados 10 carotenóides em amora-preta (*Rubus* spp.), sendo all-*trans*-β-caroteno (39,6 %), all-*trans*-luteína (28,2 %), all-*trans*-βcriptoxantina (13,9 %), 9-*cis*-β-caroteno (3,8%), all-*trans*-α-caroteno (3,3%), 13-*cis*-β-criptoxantina (3,1 %), all-*trans*-zeaxantina (2,7 %), 13-*cis*-β-caroteno (1,7 %), 5,6-epóxi-β-criptoxantina e fitoeno (0,8 %), além de um carotenóide não identificado representando 2,9 %. O perfil de carotenóides apresentado neste estudo é semelhante ao reportado anteriormente, com exceção

da xantofila 13-*cis*- β -criptoxantina, reportada pela primeira vez em frutas vermelhas.

A curdlana foi escolhida como material de parede para encapsular o extrato antociânico pela técnica de gelificação térmica por manter suas propriedades gelificantes em pH em torno de 2 e por não necessitar do tempo de cura sob refrigeração, formando um gel firme a 80 °C. As condições mais adequadas para o processo de encapsulação foram: 40 °C para a solução de antocianina e curdlana, banho quente de óleo a 80 °C e nível de 6 cm, além da altura de 4 cm entre o bico atomizador e o banho de óleo.

O processo de gelificação térmica não alterou o perfil de antocianinas da amora. As partículas formadas por gelificação térmica com 4,3, 5,1 e 5,6 % de curdlana apresentaram forma esférica e multinucleada. A distribuição de tamanho das partículas formadas apresentou perfil semelhante para as diferentes concentrações de curdlana, e para as partículas com 5,6 % de curdlana, obteve-se maior uniformidade no tamanho das partículas, como resultado de uma maior eficiência de encapsulação. O aumento na concentração de goma melhorou a eficiência de encapsulação e aumentou a umidade das partículas.

O perfil de liberação das antocianinas em partículas de curdlana ajustou-se a cinética exponencial de primeira ordem, apresentando 100 % de liberação nos primeiros 20 minutos, independente da concentração de curdlana.