



UNICAMP

Instituto de Química



Grupo de Pesquisas em Química
Analítica e Educação

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**“EXTRAÇÃO, ESTABILIDADE E QUANTIFICAÇÃO
DE ANTOCIANINAS DE FRUTAS TÍPICAS BRASILEIRAS PARA
APLICAÇÃO INDUSTRIAL COMO CORANTES”**

Autora: MARTHA MARIA ANDREOTTI FAVARO

Orientadora: PROF^a. DR^a. ADRIANA VITORINO ROSSI

Janeiro 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

F277e Favaro, Martha Maria Andreotti.
Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas
de frutas típicas brasileiras para aplicação como corantes /
Martha Maria Andreotti Favaro. -- Campinas, SP: [s.n],
2007.

Orientadora: Adriana Vitorino Rossi.

Tese - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Antocianinas. 2. Frutas típicas brasileiras.
3. Corantes. I. Rossi, Adriana Vitorino. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Extraction, stability and qualification of anthocyanins of Brazilian
typical fruits for industrial application as colorants.

Palavras-chaves em inglês: Anthocyanins, Brazilian typical fruits, Colorants

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Adriana Vitorino Rossi (orientadora), Maria Izabel Maretti Silveira
Bueno (IQ-UNICAMP), Marcelo Telascrêa (Anidro do Brasil Extrações Ltda)

Data de defesa: 28/01/2008

Sê a expressão da bondade de Deus,

Bondade expressa em teu rosto

e nos teus olhos,

bondade nos teus sorrisos

e na tua saudação.

Às crianças, aos pobres

e a todos aqueles que sofrem

na carne e na alma,

oferece sempre um sorriso de alegria.

Dá a eles não só o teu auxílio

mas também o seu coração.

O amor torna tudo brilhante, agradável e vantajoso.

O amor é o vaso que contém alegria! (Mãe Tereza de Calcutá)

Dedico esta dissertação à minha família,

Paulo, Cecília, Myrian e Matheus

por todo incentivo e apoio

em todos os momentos.

Amo Vocês!

AGRADECIMENTOS

À profa Dra. Adriana Vitorino Rossi pelo apoio e incentivo desde a graduação na iniciação científica e em todas as etapas deste trabalho e pelas conversas e conselhos em diversas situações, tanto profissionais como pessoais.

Ao Grupo CentroFlora, e todos os envolvidos no projeto corantes, pelo incentivo ao convênio, e oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

À toda direção, aos professores e funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, em especial à Acácia Adriana Salomão, a técnica mais dedicada e atenciosa que existe, pelas diversas contribuições e suporte técnico na realização deste trabalho. Além, é claro, das situações de diversão com essa pessoa tão especial e única. E também à CPG representada pela Bel por toda paciência e apoio acadêmico.

Aos professores doutores, Paulo José Samenho Moran e Maria Izabel Maretti Silveira Bueno por suas importantes contribuições neste trabalho pela participação no meu Exame de Qualificação.

Aos meus amigos, Ricardo, Daniel, Fernando e Rafael; meninas da Fono, Dani, Cíntia, Paloma, Raquel, Débora e Mariana; Patty, Melissa, Camila, Edson e Maurício, pela amizade, paciência e momentos de descontração que apaziguaram os momentos de cansaço físico e mental. E sem esquecer daquelas amigas que mesmo distantes participaram intensamente de toda essa etapa e são muito especiais, Vivi e Mari. E a todos os membros e ex-membros do GPQUAE que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, Dani, Pati, Tânia, Jú, Lú...

E um agradecimento mais que especial aos meus pais, Paulo e Cecília Favaro, pelos valores a mim passados desde criança, incentivos e broncas quando necessário e aos meus irmãos Myrian e Matheus Favaro que sempre estiveram ao meu lado. Sem dúvida a melhor família do mundo; Deus não poderia ter me colocado em lugar melhor. AMO VOCÊS!!!!

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

Espero não ter esquecido de ninguém. A todos, minha eterna gratidão!

CURRÍCULO DA AUTORA

- Graduação – *Bacharelado em Química*

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP *Conclusão:* 07/2004

- Graduação – *Bacharelado em Química Tecnológica*

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP *Conclusão:* 12/2004

TRABALHOS DESENVOLVIDOS EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- Elaboração e execução do trabalho *“Quantificação de Tetraciclinas com Medidas Fotométricas em Dispositivo Portátil”* Período: outubro/2002 a julho/2003. Bolsista PIBIC/CNPq. Orientação: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi
- Elaboração e execução do trabalho *“Quantificação de Tetraciclinas em Medicamentos com Medidas Fotométricas em Dispositivo Portátil”*. Período: agosto/2003 a julho/2004. Bolsista SAE-UNICAMP. Orientação: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- *“Quantificação de Tetraciclina com Medidas Fotométricas em Dispositivo Portátil”* no XI CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 25 e 26/setembro/2003.
- *“Quantificação de Tetraciclina com Medidas Fotométricas em Dispositivo Portátil”* no XXVI CONGRESSO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA e 27ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30/maio a 2/junho/2004.
- *“Quantificação de Tetraciclinas em Medicamentos com Medidas Fotométricas em Dispositivo Portátil”* no XII CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 22 e 23/setembro/2004.
- *“Validação de Método para Determinação de Paracetamol em Formulações Farmacêuticas usando Equipamento Portátil”* no 13º ENQA – ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA e 1º CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE QUÍMICA ANALÍTICA, 12 a 16/setembro/2005.
- *“SIMPEQ – Simpósio de Profissionais do Ensino de Química: um espaço para professores de Campinas-SP e região há 5 anos”* na 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 19 a 22/maio/2006.
- *“X-Ray Spectroscopy and Multivariate Calibration Applied to Soil Samples”* na 10th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, 10 a 15/setembro/2006.

- “SIMPEQ – Simpósio de Profissionais do Ensino de Química: 6 anos de espaço para professores de Campinas e região” no 1º CONGRESSO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA DA UNICAMP, 5 a 7/dezembro/2006.
- “Extração e Estabilidade de Antocianinas de fruto da família Myrtaceae” na 30ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31/maio a 03/junho/2007.
- “Estudo Comparativo de Métodos de Quantificação de Antocianinas em Frutas Típicas do Brasil” no 14º ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica, 07 a 11/outubro/2007.

ESTÁGIO

- Estágio na empresa Anidro do Brasil Extrações Ltda, Grupo CentroFlora – Botucatu – S.P., de 14 a 18/05/2007, 40 horas, no laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento.

ATIVIDADES EXTRA-CURRICULARES

- Participação no II SIMPÓSIO DE PROFISSIONAIS DO ENSINO DE QUÍMICA (SIMPEQ), realizado em 09 e 10/novembro/2002, no IQ-UNICAMP.
- Monitora no III SIMPÓSIO DE PROFISSIONAIS DO ENSINO DE QUÍMICA (SIMPEQ), realizado em 12 e 13/setembro/2003, no IQ-UNICAMP.
- Participação na – III Semana de Química – “A Química que Constrói: A Contribuição da Ciência no Desenvolvimento da Sociedade” – IQ-UNICAMP, 6 a 10/outubro/2003.
- Monitora no IV SIMPÓSIO DE PROFISSIONAIS DO ENSINO DE QUÍMICA (SIMPEQ), 17 e 18/setembro/2004, no IQ-UNICAMP.
- Monitora no I ENCONTRO PAULISTA DE PESQUISA EM ENSINO DE QUÍMICA (EPPEQ), 17 e 18/setembro/2004, no IQ-UNICAMP.
- Participação na – IV Semana de Química – “Química: Ciência em todas etapas da vida” – IQ-UNICAMP, 5 a 8/outubro/2004.
- Monitora no V SIMPÓSIO DE PROFISSIONAIS DO ENSINO DE QUÍMICA (SIMPEQ), 9 e 10/setembro/2005, no IQ-UNICAMP.
- Monitora no VII SIMPÓSIO DE PROFISSIONAIS DO ENSINO DE QUÍMICA (SIMPEQ), 5 e 6/outubro/2007, no IQ-UNICAMP.

Para maiores detalhes, consultar Currículo Lattes

RESUMO

“EXTRAÇÃO, ESTABILIDADE E QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS DE FRUTAS TÍPICAS BRASILEIRAS PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL COMO CORANTES”

Aluna: Martha Maria Andreotti Favaro

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi

Antocianinas (ACYS) são corantes encontrados em vegetais, responsáveis pela coloração de flores, frutas e folhas de azul a vermelho. A proposta de estudos analíticos envolvendo extração, estabilidade e quantificação de ACYS, visando a obtenção de extratos padronizados a partir de diferentes frutas, leva em consideração as novas perspectivas do uso desses pigmentos como corantes em diversos segmentos da indústria, tais como, farmacêutico, cosmético e alimentício. Neste trabalho, foram estudadas 3 frutas típicas brasileiras congeladas: jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), amora (*Morus nigra*) e amora preta (*Rubus sp*), visando maximizar a quantidade de ACYS extraídas e obter extratos com maior durabilidade. As condições estudadas foram: tipo de solvente, adição de conservantes em solvente aquoso, temperaturas de extração e armazenamento, tempo de armazenamento e, para a jabuticaba, foi estudada a influência do uso da fruta inteira na extração e estabilidade dos extratos. O solvente extrator que apresentou maior capacidade extratora além de oferecer maior estabilidade aos extratos foi etanol 94% v/v. O conjunto de conservantes Nipagin 0,01 % m/v +Nipazol 0,05 % m/v forneceu os melhores resultados, reduzindo a degradação das ACYS e impedindo o aparecimento de fungos. Em condição otimizada, foram encontrados os seguintes teores de ACYS nas frutas, expressos em mg ACYS / 100 g: $40,0 \pm 0,2$ em casca de jabuticaba, 153 ± 3 em amora e 83 ± 2 em amora preta. Estudos comparativos de diversos procedimentos de quantificação de ACYS, incluindo o método oficial e padrões de ACYS, foram realizados, incluindo-se simplificações, visando aplicação de rotina industrial. Medidas de absorbância dos extratos em pH 1,0 no comprimento de onda de absorção máxima das ACYS mostraram ser adequadas para quantificar ACYS totais sem a necessidade do uso de padrões comerciais.

ABSTRACT

“EXTRACTION, STABILITY AND QUANTIFICATION OF ANTHOCYANINS FROM BRAZILIAN TYPICAL FRUITS FOR INDUSTRIAL APPLICATION AS COLORANTS”

Author: Martha Maria Andreotti Favaro

Adviser: Prof. Dr. Adriana Vitorino Rossi

Anthocyanins (ACYS) are pigments found in plants that give colors from red to blue to flowers, fruits and leaves. The proposal of analytical studies involving extraction, stability and quantification of ACYS from different fruits takes into account the new perspectives of using these pigments in several segments of the industry, such as, pharmaceutical, cosmetic and food. In this work, extracts of 3 Brazilian typical frozen fruits: jaboticaba (*Myrciaria culiflora*), mulberry (*Morus nigra*) and blackberry (*Rubus sp*), were studied aiming to maximize the amount of extracted ACYS and to obtain extracts with longer durability. The studied conditions were: type of solvent, addition of preservatives in aqueous solvent, temperature of extraction and storage and storage time. The influence in extraction and stability of the extracts using the whole fruit was studied for jaboticaba. Ethanol 94% v/v was the extractor solvent which resulted in greater capacity of extraction and afforded the most stable extracts. The mixture of Nipagin 0,01 % w/v + Nipazol 0,05 % w/v preservatives provided the best results, reducing the degradation of ACYS and preventing the fungi emergence. At optimized conditions, the levels of ACYS in the fruits, expressed in mg ACYS / 100 g were: $40,0 \pm 0,2$ in jaboticaba, 153 ± 3 in mulberry and 83 ± 2 in blackberry. Comparative studies of different procedures for quantification of ACYS, including the official method and the use the ACYS commercial standards were done, including simplifications to be used in industrial routine. The results showed that the method which uses measurements of absorbance of extracts at pH 1,0 and at the wavelength of maximum absorption of ACYS allows easily quantify total ACYS without necessity of using commercial standards;

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas e Termos.....	xix
Lista de Tabelas.....	xxi
Lista de Figuras.....	xxiii
 Apresentação do Convênio.....	 1
 Capítulo 1: INTRODUÇÃO.....	 5
1.1. Antocianinas.....	7
1.2. Extração.....	15
1.3. Estabilidade.....	16
1.4. Quantificação.....	17
1.5. Fontes de Antocianinas.....	19
1.5.1. Amora (<i>Morus nigra</i>).....	19
1.5.2. Amora Preta (<i>Rubus sp</i>).....	20
1.5.3. Jabuticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i>).....	20
 Capítulo 2: OBJETIVOS.....	 23
 Capítulo 3: PARTE EXPERIMENTAL.....	 27
3.1. Considerações Gerais.....	29
3.2. Reagentes, Materiais e Equipamentos.....	29
3.2.1. Reagentes.....	29
3.2.2. Padrões de ACYS.....	30
3.2.3. Soluções de pH conhecido.....	30
3.2.4. Materiais e Equipamentos.....	30

3.3. Procedimentos Experimentais.....	31
3.3.1. Extração.....	31
3.3.1.1. Jabuticaba e Refugo.....	33
3.3.1.2. Amora e Amora Preta.....	34
3.3.1.3. Verificação da perda de ACYS por “extração indireta”.....	34
3.3.2. Estabilidade.....	35
3.3.2.1. Teste com conservantes.....	35
3.3.3. Secagem dos Extratos.....	36
3.3.4. Quantificação.....	36
3.3.4.1. Método de Petri/Krawczyk/Kéry.....	37
3.3.4.2. Método de Sondheimer & Kertesz.....	37
3.3.4.3. Método de Fuleki & Francis.....	38
3.3.4.4. Método Oficial.....	38
3.3.4.5. Adapatações no Método do pH diferencial.....	39
3.3.4.6. Análises dos Extratos por HPLC.....	40
3.3.5. Quantificação espectrofotométrica de ACYS Individuais.....	41
 Capítulo 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 43
4.1. Otimização de condições de extração de ACYS.....	45
4.1.1. Jabuticaba e Refugo.....	46
4.1.2. Amora e Amora Preta.....	49
4.1.3. Verificação da perda de ACYS por “extração indireta”.....	50
4.2. Testes de estabilidade dos extratos de ACYS.....	51
4.2.1. Jabuticaba e Refugo.....	52
4.2.2. Amora e Amora Preta.....	53
4.2.3. Teste com Conservantes.....	54
4.3. Secagem dos Extratos.....	54

4.4. Quantificação das ACYS.....	56
4.4.1. Método de Petri/Krawczyk/Kéry.....	56
4.4.2. Método de Sondheimer & Kertesz.....	57
4.4.3. Método de Fuleki & Francis – Método do pH Diferencial.....	58
4.4.4. Método Oficial.....	59
4.4.5. Adaptações no Método do pH diferencial.....	60
4.4.6. Análises dos Extratos por HPLC.....	61
4.5. Quantificação espectrofotométrica de ACYS individuais.....	69
Capítulo 5: CONCLUSÕES.....	71
Capítulo 6: TRATAMENTO DE RESÍDUOS.....	75
Capítulo 7: PERSPECTIVAS.....	79
Capítulo 8: REFERÊNCIAS.....	83
Anexo 1: Informações de características físico-químicas e microbiológicas da água corrente utilizada nos experimentos.....	97
Anexo 2: Avaliação de vazão da capela pela Comissão de Segurança do Instituto de Química da UNICAMP.....	101
Anexo 3: Testes estatísticos utilizados para análise dos dados.....	103
Anexo 4: Estrutura dos padrões de ACYS utilizados no estudo com espectrofotometria....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E TERMOS

λ : Comprimento de Onda

$\lambda_{\text{máx}}$: Comprimento de Onda de Absorção Máxima

A: Absorbância

ACYS: Antocianinas

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

D: Desempenho de Extração

ExInd: Extração Indireta

F: Método de Fuleki & Francis – Método do pH Diferencial

F1C: Método do pH Diferencial com medidas em pH 1,0 e em 2 comprimentos de onda

F1S: Método do pH Diferencial com medidas em pH 1,0 e somente $\lambda_{\text{máx}}$ das ACYS

FA: Fator de Ajuste

FAC: Método do pH Diferencial com medidas sem ajuste de pH e em 2 λ

FAS: Método do pH Diferencial com medidas sem ajuste de pH e somente $\lambda_{\text{máx}}$ das ACYS

FC: Método Oficial

FS: Método do pH Diferencial sem medidas em 700 nm

GPQUAE: Grupo de Pesquisa em Química Analítica e Educação

HLPC: *High Liquid Performance Chromatography*

P: Método de Petri//Krawczyk/Kéry

S: Método de Sondheimer & Kertesz

SIMPEQ: Simpósio de Profissionais do Ensino de Química

T_{amb}: Temperatura Ambiente

T_{refrig}: Temperatura sob refrigeração

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

UV-VIS: Ultravioleta-Vísivel

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de Extração testadas.....	23
Tabela 2: Valores médios de absorvância em $\lambda_{\text{máx}}$ (514 nm) dos extratos das frutas nas diferentes condições de extração e solventes (água corrente e água destilada).....	34
Tabela 3: <i>Desempenho de Extração</i> de ACYS (%) com solventes alcoólicos, para jabuticaba e refugo, considerando 100 % a quantidade de ACYS extraídas com água corrente.....	36
Tabela 4: <i>Desempenho de Extração</i> dos solventes alcoólicos, para as 2 espécies de amoras, considerando 100 % a extração obtida em água corrente.....	38
Tabela 5: Valores de degradação % das ACYS nos extratos de amora e amora preta.....	41
Tabela 6: Concentração de ACYS nas amostras das frutas estudadas, expressa em termos de cianidina-3-glicosídeo.....	48
Tabela 7: ACYS encontradas em jabuticaba de acordo com a literatura e presentemente identificadas nas amostras dos extratos aplicando o método de Goiffon/Mouly/Gaydou.....	49
Tabela 8: ACYS encontradas em refugo de jabuticaba de acordo com a literatura e presentemente identificadas nas amostras dos extratos aplicando o método de Goiffon/Mouly/Gaydou.....	49
Tabela 9: ACYS encontradas em amora de acordo com a literatura e presentemente identificadas nas amostras dos extratos aplicando o método de Goiffon/Mouly/Gaydou.....	50
Tabela 10: ACYS encontradas em amora preta de acordo com a literatura e presentemente identificadas nas amostras dos extratos aplicando o método de Goiffon/Mouly/Gaydou.....	50
Tabela 11: Tempo de retenção (t_R) dos padrões de ACYS.....	51
Tabela 12: Concentrações de ACYS totais obtidas por HPLC nas frutas estudadas.....	55
Tabela 13: Número de grupos metoxila e hidroxila nas estruturas dos padrões de ACYS utilizados.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas dos principais flavonóides.....	3
Figura 2: Estrutura do cátion flavílico.....	3
Figura 3: Biossíntese das ACYS.....	3
Figura 4: Estrutura genérica de algumas antocianinas.....	4
Figura 5: Transformações estruturais de ACYS com mudanças no pH do meio.....	6
Figura 6: Estrutura da <i>cis</i> -chalcona ionizada.....	12
Figura 7: Foto ilustrativa da amora (<i>Morus nigra</i>).....	12
Figura 8: Foto ilustrativa da amora preta (<i>Rubus sp</i>).....	12
Figura 9: Foto ilustrativa da jabuticaba (<i>Mircyaria cauliflora</i>).....	12
Figura 10: Estrutura dos conservantes utilizados nos estudos de estabilidade.....	22
Figura 11: Espectros de extratos de jabuticaba, refugo, amora e amora preta obtidos em água corrente como solvente extrator na proporção 1:3 massa de fruta:volume de solvente, utilizando água corrente como branco.....	33
Figura 12: Espectros médios dos extratos de jabuticaba e refugo em diferentes solventes de extração: 1) água corrente, 2) etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v), 3) álcool de cereais e 4) etanol 94 % a partir de extratos preparados na proporção 1:3 fruta:solvente (m/v) apenas com as cascas. Os solventes extratores foram utilizados como branco.....	36
Figura 13: Espectros médios dos extratos de amora e amora preta em diferentes solventes de extração: 1) água corrente, 2) etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v) e 3) álcool de cereais a partir de extratos preparados na proporção 1:3 fruta:solvente (m/v). Os solventes extratores foram utilizados como branco.....	37
Figura 14: Espectro do resíduo líquido restante no frasco de jabuticaba utilizando água corrente como branco.....	38
Figura 15: Perfil de secagem dos extratos na capela para o Refugo. *massa do sistema = massa do solvente + massa extrato seco.....	43

Figura 16: Perfil de secagem dos extratos no rotaevaporador para o Refugo. *massa do sistema = massa do solvente + massa extrato seco.....	43
Figura 17: Curva analítica para quantificação de ACYS total pelo método de Petri/Krawczyk/Kéry.....	44
Figura 18: Estrutura do padrão Cloreto de Pelargonidina.....	44
Figura 19: Curva analítica obtida pelo método de Sondheimer & Kertesz utilizando o corante vermelho do Congo.....	45
Figura 20: Estrutura do corante vermelho do Congo.....	45
Figura 21: Estrutura do padrão cloreto de cianidina-3-glicosídeo.....	44
Figura 22: Cromatograma do padrão cloreto de cianidina-3-galactosídeo 20,0 mg L ⁻¹ . Condições cromatográficas: coluna C18, fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 (v/v/v), volume de injeção 20 µL e detecção espectrofotométrica em 520, 525 e 540 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....	52
Figura 23: Curva analítica com adição de padrão de cianidina-3-glicosídeo numa amostra de jabuticaba.....	53
Figura 24: Cromatograma obtido a partir da amostra de extrato seco de jabuticaba em HCl 0,1% (v/v). Condições cromatográficas: coluna C18, fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 (v/v/v), volume de injeção 20 µL e detecção espectrofotométrica em 520, 525 e 540 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....	53
Figura 25: Cromatograma obtido a partir da amostra de extrato seco de refugo em HCl 0,1% (v/v). Condições cromatográficas: coluna C18, fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 (v/v/v), volume de injeção 20 µL e detecção espectrofotométrica em 520, 525 e 540 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....	54
Figura 26: Cromatograma obtido a partir da amostra de extrato seco de amora em HCl 0,1% (v/v). Condições cromatográficas: coluna C18, fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 (v/v/v), volume de injeção 20 µL e detecção espectrofotométrica em 520, 525 e 540 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....	54

Figura 27: Cromatograma obtido a partir da amostra de extrato seco de amora preta em HCl 0,1% (v/v). Condições cromatográficas: coluna C18, fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 (v/v/v), volume de injeção 20 µL e detecção espectrofotométrica em 520, 525 e 540 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....**55**

Figura 28: Espectros UV-VIS das soluções dos padrões comerciais de ACYS 40 mg L⁻¹ em metanol com HCl 0,1 % (v/v) utilizados no presente trabalho. p1: cloreto de pelargonidina, p2: cloreto de malvidina-3-glicosídeo, p3: cloreto de pelargonidina-3-glicosídeo, p4: cloreto de cianidina-3-galactosídeo, p5: cloreto de cianidina-3-glicosídeo, p6: cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo, p7: cloreto de cianidina-3-rutinosídeo e p8: cloreto de peonidina-3-glicosídeo. Branco: metanol com HCl 0,1 % (v/v).....**56**

APRESENTAÇÃO CONVÊNIO

As atividades realizadas neste trabalho fizeram parte de um projeto mais amplo de convênio de colaboração científica entre a UNICAMP e a empresa Anidro do Brasil Extrações Ltda (processo 11-P-09209/2006) mediante interação com o GPQUAE - Grupo de Pesquisas em Química Analítica e Educação (Termo Aditivo 01, processo 11-P-09214/2006).

O objeto do referido Convênio é estabelecer condições de cooperação técnico-científica entre a UNICAMP e a ANIDRO por meio do GRUPO CENTROFLORA, considerando a necessidade de intercâmbio em um conjunto de competências complementares para as partes, abrangendo as atividades de disseminação do conhecimento, prestação de serviços, pesquisa e desenvolvimento, formação e treinamento de recursos humanos, absorção e transferência de tecnologias passíveis de aplicação comercial e industrial, através da interação e relacionamento entre as partes.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1. Antocianinas

Pigmentos naturais que são responsáveis pela coloração de flores, frutas e vegetais são chamados de agentes cromóforos e estão inseridos em três importantes classes, as porfirinas, os carotenóides e os flavonóides¹⁻⁵. Os flavonóides são subdivididos em 11 classes menores, sendo que as mais importantes são: flavanas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianinas (ACYS), ilustradas na Figura 1^{1,6}.

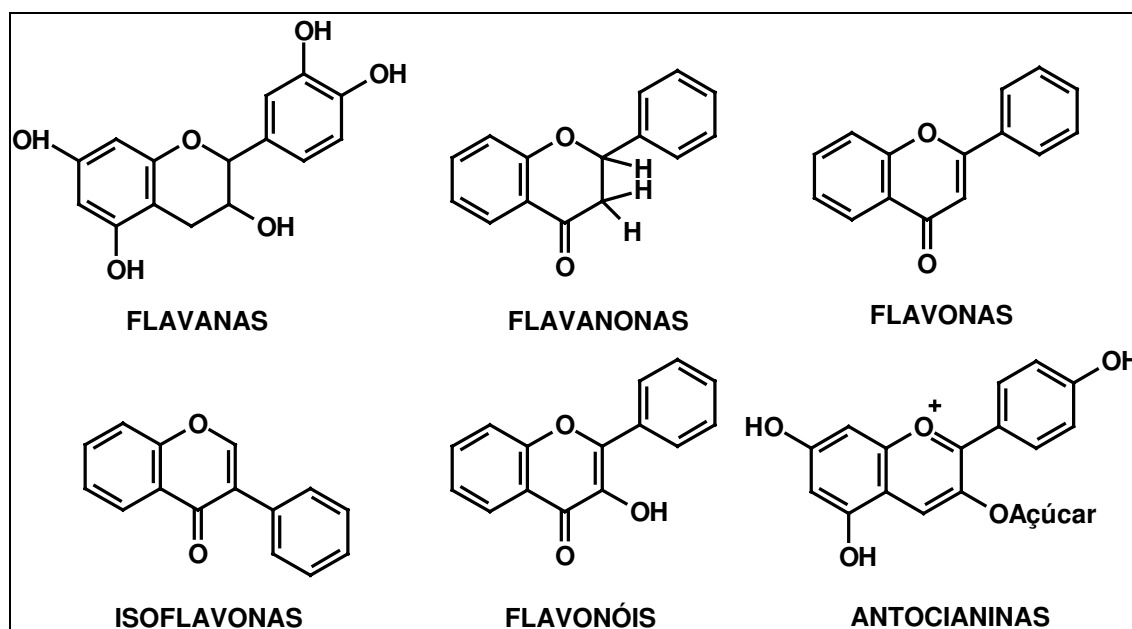


Figura 1: Estruturas dos principais flavonóides^{1,6}

ACYS são importantes flavonóides que apresentam cores visíveis ao olho humano^{1,7-8}. O termo antocianina (do grego anthos = flores; kianos = azul) foi proposto em 1835 por Marquat, referindo-se a pigmentos azuis, violetas e vermelhos encontrados em flores¹. Atualmente, sabe-se que estes pigmentos são responsáveis pelas cores: laranja, rosa, vermelha, violeta e azul de flores, frutas e também de folhas^{4-5,9}.

Uma das principais funções das ACYS em flores e frutas é o poder de atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes, além de proteger diversos tecidos da planta de processos oxidativos, durante diversas etapas de seu ciclo de vida, principalmente em fases iniciais do crescimento⁷⁻⁸.

ACYS ocorrem na natureza como glicosídeos de antocianidinas e podem ser aciladas com ácidos orgânicos ou alifáticos como, coumárico, caféico, ferúlico, p-hidroxibenzóico, acético, malônico, succínico, oxálico e ácidos málicos¹⁰⁻¹³. Sua estrutura geral é derivada do cátion flavílico (Figura 2)^{1,8}.

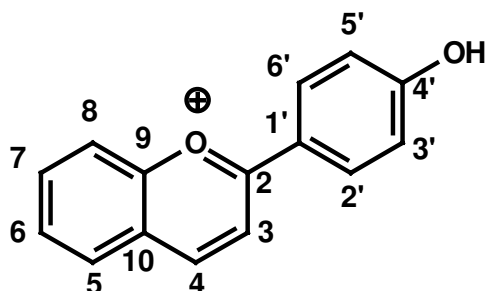


Figura 2: Estrutura do cátion flavílico^{1,8}

ACYS podem ser obtidas a partir da biossíntese indicada na Figura 3, a qual também explica a presença da carga positiva na estrutura.

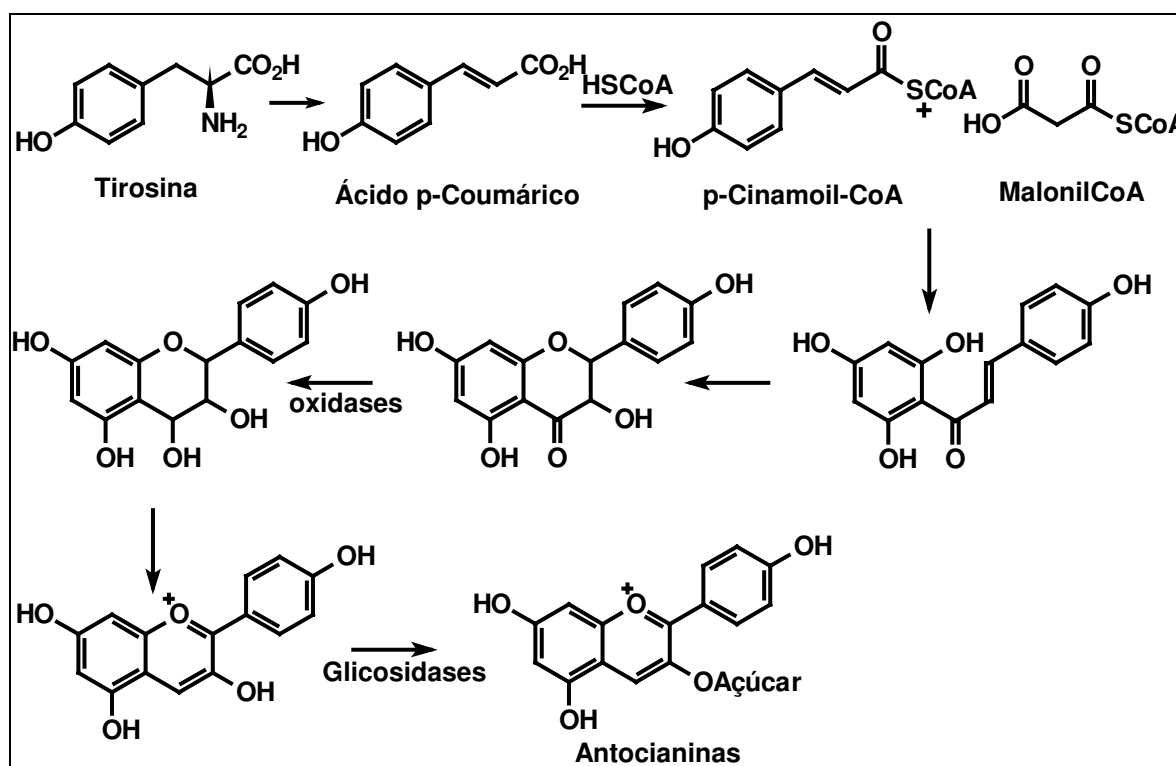


Figura 3: Biossíntese das ACYS^{1,8}

Assim como as antocianidinas, as antocianinas possuem um grupo hidroxila nas posições 3, 5 e 7. Somente nas ACYS, uma ou mais destas hidroxilas estão ligadas a açúcares, sendo os mais comuns: glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose, que ocorrem como mono, di e/ou triglicosídeos ^{1,8,12}.

Em ACYS, as posições ocupadas por açúcares, em ordem de preferência, são: 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Quando há apenas uma substituição com glicosídeo, a posição 3 é preferencial. Quando dois açúcares estão presentes, geralmente um está na posição 3 e o outro pode estar em 3 como um dissacarídeo ou nas posições 5, 7, 3', 4' e 5' ^{1,8,12}.

Os diglicosídeos podem ser constituídos de isômeros do mesmo açúcar ou combinações de dois açúcares distintos; o mesmo ocorrendo com triglicosídeos. Quando é comparada a estabilidade das ACYS substituídas com di e/ou triglicosídeos, observa-se que estas são mais estáveis que suas correspondentes monoglicosiladas ^{1,12}.

O açúcar presente nas moléculas das ACYS confere maior solubilidade e estabilidade a estas substâncias, quando comparadas às antocianidinas ⁸, além de terem efeitos determinantes nos processos de absorção e excreção das ACYS em ratos e seres humanos ¹⁴.

A Figura 4 ilustra a estrutura genérica de algumas ACYS.

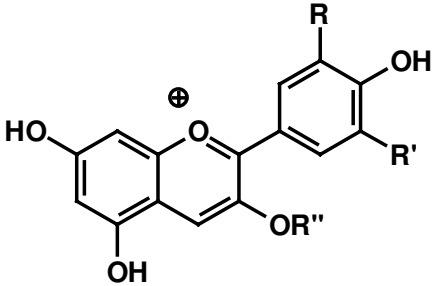
	Antocianina	Grupo R	Grupo R'	Grupo R''
	Cianidina 3-glicosídeo	OH	H	glicose
	Cianidina 3-galactosídeo	OH	H	galactose
	Cianidina 3-rutinosídeo	OH	H	rutinose
	Delfinidina 3-glicosídeo	OH	OH	glicose
	Pelargonidina 3-glicosídeo	H	H	glicose
	Malvidina 3- glicosídeo	OCH ₃	OCH ₃	glicose
	Peonidina 3-glicosídeo	OCH ₃	H	glicose

Figura 4: Estrutura genérica de algumas antocianinas ^{1,8}.

Na Figura 4, o grupo R'' é sempre representado por açúcares, o que caracteriza as ACYS; quando este grupo é um H, trata-se de uma molécula de antocianidina.

A coloração das soluções de ACYS sofre influência do número de hidroxilas, grupos metoxilas e glicólicos presentes na estrutura. Quanto maior o número de metoxilas, mais intensa é a cor vermelha; enquanto que mais hidroxilas e grupos glicólicos intensificam a cor azul ³.

O grau de hidroxilação e metoxilação também se relacionam com a estabilidade das ACYS, que aumenta com o número de metoxilas e diminui com o número de hidroxilas ^{12,15-16}. Além disso, outros fatores também podem influenciar na coloração das soluções de ACYS, tais como: presença de pequenas quantidades de outros pigmentos, quelação com metais, pH do fluído da célula vegetal e copigmentação com outros flavonóides ^{3,11}.

A forma estrutural das ACYS quase planar com extensa deslocalização eletrônica facilita a formação de complexos ^{1,12}. Íons metálicos trivalentes tais como Al^{3+} e Fe^{3+} são os principais responsáveis pela complexação de ACYS com metais, enquanto Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^{+} que são mais abundantes nos tecidos das plantas, aparentemente não formam complexos com as ACYS ^{1,12}.

O principal mecanismo de estabilização de ACYS em solução é a copigmentação ¹⁷, que pode envolver interações inter ou intramoleculares. As interações intermoleculares podem ocorrer por associação de 2 ou mais moléculas de antocianina, envolvendo ou não um íon metálico. Também podem ocorrer por associação com outros compostos fenólicos, proteínas, açúcares ácidos, nucleícos, ácidos orgânicos e minerais, aminoácidos, alcalóides e outros flavonóides. Todos esses fatores levam a uma proteção efetiva contra o ataque nucleofílico pela água, principalmente nas posições 2 e 4, sendo confirmada por espectros de RMN-H ^{1,13,17-18}.

ACYS aciladas têm sido alvo de estudos, pois são mais resistentes à hidrólise e aos efeitos de variação de pH, sendo mais estáveis em sistemas naturais quando comparadas às ACYS não-aciladas ^{2,10,19}. Ácido ferúlico, um derivado do ácido cinâmico, constitui o principal grupo acila na estrutura de ACYS aciladas ¹⁸. Porém, poucas são as espécies vegetais já citadas que apresentam maiores quantidades de ACYS aciladas, como é a cenoura preta ², que não é tipicamente encontrada no Brasil.

No início do século XX, Willstätter e Robinson relacionaram as ACYS como sendo pigmentos responsáveis pela coloração de diversas flores e que seus extratos apresentavam cores que variavam em função do pH do meio em que se encontravam ²⁰.

A propriedade das ACYS apresentarem diferentes cores, dependendo do pH do meio, faz com que esses pigmentos possam ser utilizados como indicadores naturais de pH ²⁰⁻²¹.

Vários autores têm estudado as propriedades indicadoras de pH das ACYS para aplicações didáticas no Ensino de Química, para determinar o pH de materiais de uso doméstico, para indicar o ponto final de titulações ácido-base, dentre outras ^{20,22-25}.

A Figura 5 ilustra as transformações estruturais das ACYS em solução com a mudança de pH do meio ^{9,12,20}.

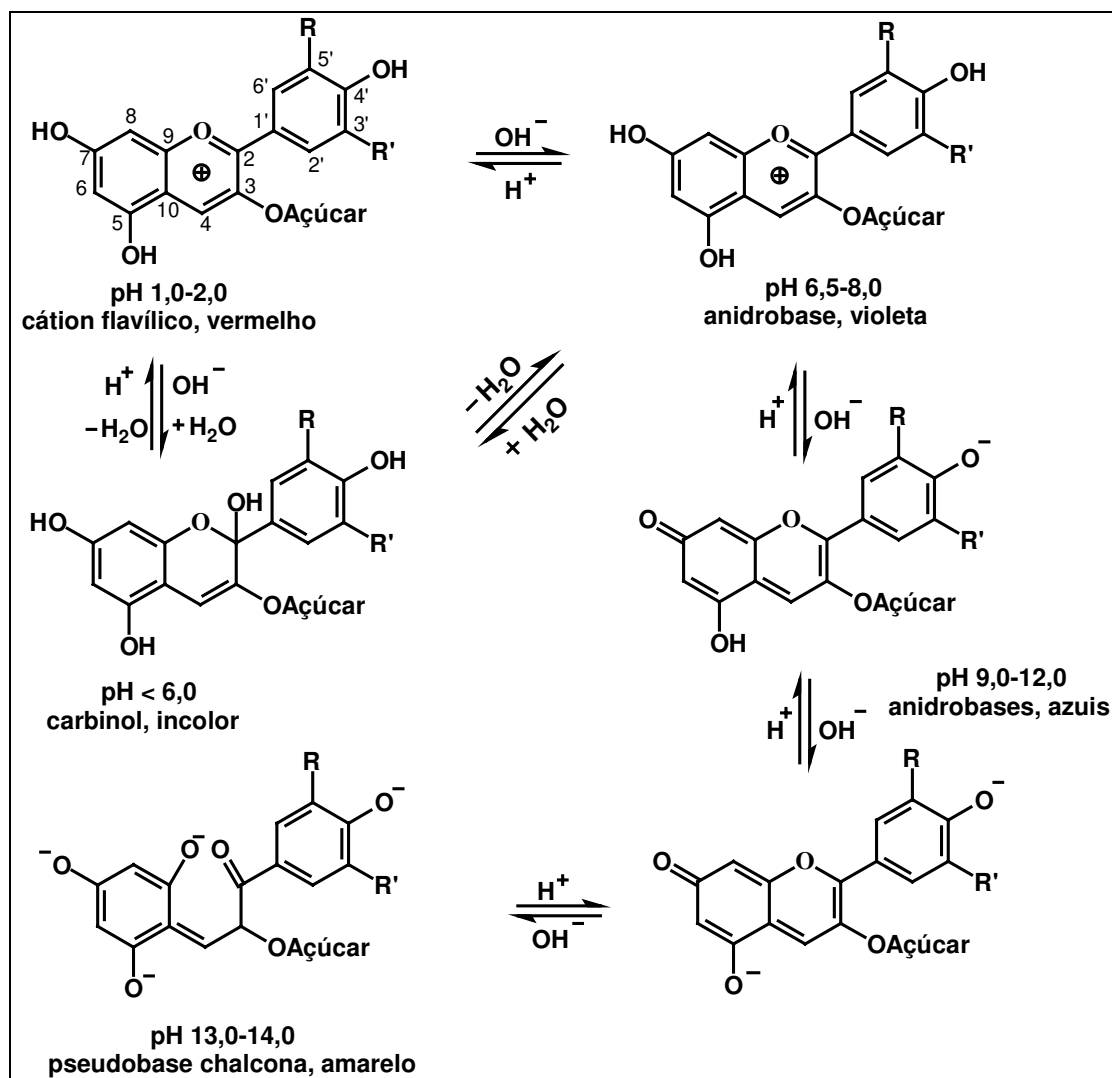


Figura 5: Transformações estruturais de ACYS com mudanças no pH do meio ^{9,12,20}.

Atualmente observa-se um crescente interesse no uso de ACYS em diversos segmentos, dentre os quais se destacam as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, onde podem ser aplicadas, por exemplo, como corantes, principalmente corantes vermelhos os quais são os corantes naturais mais difíceis de encontrar na natureza em forma estável ²⁶.

A principal função dos corantes em produtos industrializados é proporcionar a melhoria na aparência dos mesmos, deixando-os mais parecidos aos produtos naturais e mais agradáveis, portanto, aos olhos do consumidor, que, desta forma, é estimulado a consumir o produto, já que aparência, ou seja, cor, sabor e odor têm um papel importantíssimo na aceitação de produtos industrializados ²⁶.

Corantes sintéticos são largamente utilizados para os mais diversos fins e dominam as aplicações em alimentos, tecidos e fármacos, principalmente por apresentarem alta estabilidade às variações de condições de uso ¹⁰. Há publicações de estudos do Codex Alimentarius, órgão ligado à Organização Mundial da Saúde (OMS), que já fundamentaram a banição de alguns corantes sintéticos em todos os países ²⁶. Em 1987, a portaria nº 02 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) relatou a proibição de alguns corantes sintéticos como: o vermelho sólido, que era usado para recheios e revestimentos de biscoitos; o escarlata GN, aplicado em recheios de confeitarias, além do azul de alizarina, corante que era usado em óleos emulsionados e gelatina, dentre outros ²⁶.

Portanto, devido à toxicidade de alguns corantes sintéticos e à proibição do uso de alguns deles, nota-se um crescente interesse por corantes obtidos a partir de fontes naturais ^{10,27-28}. Porém, o destaque dos corantes naturais tem sido gradual, já que os corantes sintéticos têm vantagens difíceis de superar. Corantes sintéticos possuem maior capacidade tintorial, representada pela melhor fixação nos produtos, com cores mais intensas e menor custo, devido ao uso de dosagens menores e preço inferior ²⁶. Além disso, sua estabilidade é bastante superior à dos corantes naturais.

As fontes naturais de corantes mais pesquisadas desde a década de 90 englobam as principais famílias cromáticas dos corantes naturais: os carotenóides, prevalecendo aqueles de coloração amarela e laranja; os porfirínicos, de coloração verde, e os flavonóides, principalmente aqueles de cor vermelha, como as ACYS ²⁶.

ACYS são sempre lembradas como alternativas para corantes sintéticos, principalmente para alimentos e cosméticos pela coloração vermelha, além de seus possíveis benefícios à saúde ^{10,29}. Nos EUA, por exemplo, extratos concentrados de cascas de uvas contendo ACYS estão comercialmente disponíveis para uso como corantes, porém, ainda isentos de certificação ^{10,29}.

Além das uvas, as ACYS são, na sua maioria, obtidas a partir de frutas e legumes, entre essas fontes estão: *blackcurrant*, *raspberry*, *cranberry*, mirtilo, cenoura preta, milho roxo e rabanete ^{2,29}.

Além dos atributos da coloração das ACYS, o interesse no uso desses compostos tem sido intensificado devido a seus possíveis benefícios à saúde ⁷. Relatos científicos apontam o uso de ACYS para controle de pressão arterial e como agente contra o diabetes e a hipoglicemia ³⁰⁻³¹. Outros estudos apontam também ação favorável na prevenção de colesterol ³², propriedades antiinflamatórias ²⁷ e aumento da acuidade visual ^{31, 33-34}.

ACYS também são agentes promissores na prevenção de doenças degenerativas como câncer ³⁵⁻³⁷, mal de Alzheimer e doenças cardiovasculares ³⁷, devido a suas propriedades antioxidantes ^{27,34,38}. Já foram descritos estudos biológicos em laboratório indicando que ACYS possuem um papel importante como protetor da oclusão de artérias cerebrais e da isquemia cerebral em ratos ³⁹ e promovem apoptose em culturas com células leucêmicas ⁴⁰⁻⁴¹.

Com relação ao metabolismo, apesar de dietas com altos teores de ACYS serem associadas com aspectos biológicos desde a década de 1990, a atividade biológica *in vivo* de ACYS, incluindo bioabsorção e subsequente metabolismo, não era fundamentada. Sabia-se que para atingir um efeito biológico num determinado órgão ou tecido (com exceção do trato gastrointestinal), componentes bioativos deveriam estar disponíveis na dieta, sendo efetivamente absorvidos, transportados pelo sistema circulatório e, então, depositados no sítio apropriado. Algumas pesquisas mostraram que ACYS permanecem intactas quando passam do trato digestivo para a circulação sangüínea em mamíferos. Estudos com seres humanos apontaram que ACYS aparecem no plasma sangüíneo, em níveis farmacologicamente ativos, depois de uma alimentação rica em frutas e legumes ^{7,42}.

ACYS também possuem um papel importante na nova categoria chamada “cosmecêutica”, termo criado há mais de 20 anos pelo Dr. Albert M. Kligman para classificar os compostos que reúnem efeitos benéficos estéticos com possíveis benefícios à saúde desses compostos, o que ainda é motivo de discussão. Produtos chamados cosmecêuticos, vêm sendo cada vez mais utilizados para tratamentos de pele e as ACYS despertam interesse para este tipo de aplicação devido a suas características antioxidantes^{27,34,38,43}. No Brasil, de acordo com Josineire Melo Costa Sallum, gerente geral de cosméticos da ANVISA⁴³, é essencial definir claramente o que são os cosmecêuticos para distinguí-los dentre cosméticos e medicamentos a fim de se debater uma política de vigilância relativa aos cosmecêuticos⁴⁴. Isto ilustra a relevância de estudos das propriedades de ACYS a fim de fundamentar o desenvolvimento de novas aplicações.

Mishra, Dolan e Yang⁴⁵, chamaram essa nova classe de compostos, dentre os quais se incluem as ACYS, de “nutracêuticos”, para indicar componentes de alimentos conhecidos por seus benefícios à saúde, prevenção de doenças ou propriedades medicinais. Os nutracêuticos não agem somente como corantes, mas também representam potenciais benefícios à saúde, principalmente com propriedades antioxidantes e antiinflamatórias⁴⁵.

O uso industrial de ACYS como corantes ainda é restrito devido a algumas limitações, dentre as quais se pode citar a baixa estabilidade e a capacidade corante reduzida, quando comparadas a corantes sintéticos, além de dificuldades na etapa de purificação. A isto, soma-se o fato de ACYS atualmente serem comercializadas a preços elevados (por exemplo, padrões de cianidina-3-glicosídeo US\$ 942,00/mg, malvidina 3-glicosídeo US\$ 852,00/mg, peonidina-3-glicosídeo US\$ 2369,00/mg).*

Como fatores limitantes para a produção dos padrões de ACYS a partir de fontes naturais, como a cianidina-3-rutinosídeo e a cianidina-3-galactosídeo⁴⁶ estão a dificuldade para isolamento e purificação, etapas de um processo de difícil implementação que envolve grande número de etapas, que reduzem o rendimento do processo, elevando consideravelmente o custo do produto final⁴⁶. Dificuldades análogas são observadas nos processos de síntese de algumas ACYS comercializadas com preços elevados (por exemplo, pelargonidina-3-glicosídeo e cianidina-3-glicosídeo)⁴⁷.

* Valores do catálogo Sigma-Aldrich 2007.

As novas perspectivas do uso de ACYS apontam a necessidade de desenvolver e/ou aperfeiçoar métodos de extração, avaliação da estabilidade e quantificação desses pigmentos visando aplicação em escala industrial.

1.2. Extração

A escolha do método de extração de ACYS depende da proposta de aplicação, no caso de aplicação industrial como é o foco do presente trabalho, é importante que seja um método simples, rápido, de baixo custo e que utilize solventes extratores de baixa toxicidade.

ACYS são solúveis em água e podem ser facilmente extraídas com solventes polares. Solventes alcoólicos, como metanol e etanol, são os mais utilizados^{11,19,27,38,48-49}. Muitos trabalhos têm empregado solventes extratores alcoólicos acidificados^{19,27} para favorecer a extração, pois auxilia a penetração do solvente nos tecidos das frutas e vegetais, além de aumentar a estabilidade dos extratos por dificultar o aparecimento de fungos que degradam as ACYS.

O uso de solventes ácidos para a extração de ACYS deve ser cauteloso, pois excesso de ácido pode levar à formação de antocianidinas e outros flavonóides por hidrólise. Em estudos quantitativos, a hidrólise das ACYS poderia gerar resultados superestimados da quantidade total de ACYS presentes na espécie estudada, principalmente se o método de análise empregado for espectrofotométrico por quantificar somente ACYS totais¹⁹.

O aquecimento durante a extração também deve ser cauteloso, pois estudos realizados indicaram que as ACYS são termicamente estáveis somente até 60°C⁴⁹⁻⁵⁰.

Alguns trabalhos têm empregado também o uso de acetona para extração de ACYS, com posterior secagem em rotaevaporador a 30°C⁵¹⁻⁵³. A principal vantagem da acetona como solvente extrator seria a maior facilidade de secagem dos extratos após o término do processo de extração, por se tratar de um solvente mais volátil e conseqüentemente requerer uma temperatura de ebulição menor. Porém, a aplicação da acetona como solvente extrator em rotina industrial não é vantajosa devido a maior toxicidade e periculosidade quando comparada com solventes aquosos e alcoólicos.

O processo de secagem dos extratos é um fator muito importante e se faz necessário por diversos motivos, como, dentre outros, a facilidade de armazenamento do produto final e será discutido posteriormente.

1.3. Estabilidade

A estabilidade de ACYS é influenciada por diversos fatores: temperaturas de extração e de armazenamento ^{2,54}, exposição à luz ⁴⁸, variações de pH e ação de agentes oxidantes ^{2,10,19,27}. A interação destes parâmetros também pode afetar a estabilidade. Por exemplo, para extratos de jambolão, a temperatura e o tempo de armazenamento influenciam menos que 1% na degradação de ACYS, enquanto que o efeito do pH é de 87% ⁴⁹.

A temperatura de extração deve ser cuidadosamente controlada, pois se sabe que ACYS são termicamente estáveis até 60°C ⁴⁹⁻⁵⁰. Por serem sensíveis ao aquecimento, altas temperaturas podem afetar a concentração de ACYS nos extratos por favorecer a extração conjunta de ácidos fenólicos e taninos, além de complexações ACYS com proteínas, o que compromete a estabilidade dos extratos ⁵¹.

A temperatura de armazenamento também é um fator que influencia na degradação de ACYS e no aparecimento de fungos nos extratos. Estudos indicam que extratos armazenados a baixas temperaturas são mais estáveis quando comparados àqueles armazenados à temperatura ambiente ^{2,54-55}.

Extratos de ACYS são mais estáveis sob proteção da luz quando comparados àqueles que permaneceram expostos à luz. A radiação UV interage no extrato de maneira a facilitar reações como, por exemplo, copigmentação com outros compostos presentes alterando a estabilidade das ACYS, além de favorecer a formação de produtos de degradação oxidativa das ACYS que possuem coloração marrom ^{48,55-56}.

Soluções muito ácidas na presença de agentes oxidantes favorecem a hidrólise ácida das ACYS, o que afeta a estabilidade dos extratos. Soluções muito alcalinas levam à formação irreversível da *cis*-chalcona ionizada ²⁰ (Figura 6), de cor amarela em solução.

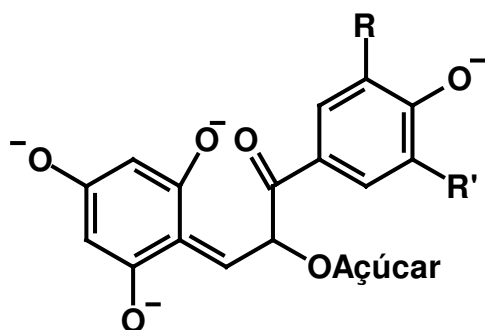


Figura 6: Estrutura da *cis*-chalcona ionizada ²⁰.

1.4. Quantificação

A quantidade e a identidade das ACYS nos vegetais também estão relacionadas a fatores genéticos e ambientais, como: condições de cultivo, tempo de plantio, exposição à luz UV e método de colheita. Por esse motivo, a comparação de teores de ACYS dentre diferentes culturas de um mesmo vegetal, como frutas, ou dentre culturas e vegetais diferentes pode gerar resultados bastante distintos. Estudos indicam que, mesmo sob iguais condições de cultivo, crescimento e fertilização podem-se observar variações de identidade e quantidade das ACYS, como em *Rubus sp* no trabalho de Siriwoharn e colaboradores e *Morus Alba* e *Morus nigra* no trabalho de Syvacy & Sökmen ⁵⁷⁻⁵⁸.

Há diversos métodos descritos na literatura para quantificar ACYS (totais ou individuais), dentre os quais se destacam aqueles que envolvem: polarografia ¹, colorimetria ¹, espectrofotometria UV-VIS ^{1,59-62}, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ¹ e espectrometria de massas ⁶³.

A quantidade de ACYS totais em extratos brutos é determinada principalmente por espectrofotometria UV-VIS. Dentre os métodos utilizados destacam-se os métodos de Petri *et al* ⁵⁹, Sondheimer & Kertesz ⁶⁰ e Fuleki & Francis ⁶¹⁻⁶², este último já com algumas adaptações introduzidas por Giusti & Wrolstad ⁶⁴.

A maioria dos métodos espectrofotométricos baseia-se nas transformações estruturais sofridas pelas ACYS em função de mudanças do pH do meio e na intensa absorção do cátion flavílico ⁶⁵.

¹ A partir deste ponto no texto, CLAE será citada pela sua sigla em inglês: HPLC.

O método oficial AOAC International para quantificação de ACYS⁶⁵ foi descrito por Lee, Durst & Wrolstad e é baseado no método do pH diferencial e nas transformações das ACYS em diferentes pHs⁶⁵.

Sondheimer & Kertesz⁶⁰, em 1948, foram os primeiros a introduzir a idéia de realizar medidas de absorção em diferentes valores de pH para realizar estudos de quantificação de ACYS. Eles utilizaram medidas em pH 2,0 e 3,4 para quantificar ACYS em geléia de morango⁶⁰.

Detalhes do procedimento e forma de obtenção dos resultados desses métodos serão apresentados na parte experimental e na sessão de resultados e discussão.

Atualmente, nota-se grande número de trabalhos de quantificação de ACYS por métodos utilizando HPLC, pois além de quantificar permitem obter informações mais detalhadas sobre os extratos estudados^{9,12,66-70}. Porém, esses métodos para determinação de ACYS totais ou individuais por HPLC podem ter sua aplicação em rotina industrial inviabilizada por demandarem o uso dos caros padrões comerciais, além de uma etapa prévia de identificação das ACYS presentes nos extratos.

Nesta dissertação, foram abordados os métodos espectrofotométricos de Petri *et al*⁵⁹, Sondheimer & Kertesz⁶⁰ e Fuleki & Francis⁶¹⁻⁶² para quantificação de ACYS totais nas frutas estudadas, além de adaptações que foram realizadas no método do pH diferencial visando simplificação do método, pois estes métodos apresentam características favoráveis para aplicação industrial como desempenho relativamente satisfatório, rapidez, baixo custo e não requerem o uso de padrões de ACYS.

Posteriormente, foi realizado um estudo comparativo entre os resultados desses métodos e suas adaptações. A partir dos resultados obtidos foi elaborado um protocolo de análise para aplicação industrial.

Condições de HPLC otimizadas por Terci para identificação de ACYS²⁰ também foram empregadas para teste de método de quantificação total de ACYS a partir de padrões comerciais visando comparação com resultados dos métodos espectrofotométricos. Além disso, foram realizados estudos tentativos para quantificação de ACYS individuais.

Vale ressaltar que os diferentes métodos de quantificação possuem diferentes condições de solubilização do material inicial para subsequente análise. Em função disso, torna-se importante uma etapa de secagem dos extratos recém preparados para dar início aos procedimentos, o que também é importante para facilitar o armazenamento e eventual comercialização dos extratos. Essa etapa foi estudada neste trabalho e será discutida na parte experimental.

1.5. Fontes de Antocianinas

As fontes de ACYS utilizadas no presente trabalho foram: amora (*Morus nigra*), amora preta (*Rubus sp*) e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*).

1.5.1. Amora (*Morus nigra*):

Pertencente à família Moraceae, nativa da China e Japão, conhecida em inglês por *mulberry*. Frutifica no Brasil de setembro a novembro; é cultivada em quintais ou pomares. Dificilmente é comercializada *in natura* por sua estrutura frágil e baixa estabilidade para armazenamento ⁷¹.

Geralmente seus frutos são utilizados para preparo de geléias e compotas. As folhas comumente são utilizadas na sericultura como alimento básico do bicho-da-seda. A árvore é ornamental pelo efeito de sua folhagem em regiões de clima mais ameno como no sul e sudeste do Brasil. É empregada no paisagismo e na arborização urbana ⁷².



Figura 7: Foto ilustrativa da amora (*Morus nigra*) ⁷³.

1.5.2. Amora Preta (*Rubus sp*):

Pertencente à família Rosaceae; a amoreira preta é uma frutífera de grande potencial para regiões de clima temperado. Muitas espécies de amoreira preta são nativas do sul do Brasil e frutificam de outubro a fevereiro. Essas espécies possuem vida pós-colheita curta devido a sua fragilidade e são conhecidas por *blackberry*⁷⁴.

É uma espécie arbustiva com porte ereto ou rasteiro; seus frutos pesam em média 5 g e são apreciados por animais e homem devido seu sabor adocicado e levemente ácido. Assim como a amora, a amora preta possui o problema de perda de água ocasionando perda de peso e a depreciação da qualidade da fruta⁷⁵⁻⁷⁶.



Figura 8: Foto ilustrativa da amora preta (*Rubus sp*)⁷⁷.

1.5.3. Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*):

Pertencente à família Myrtaceae e é uma árvore frutífera nativa da Mata Atlântica, principalmente da mata pluvial e das submatas de altitude. Ocorre desde o Mato Grosso do Sul e Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, é mais comumente encontrada nos estados de MG, ES, RJ, SP e PR. Frutifica duas vezes por ano, de janeiro a fevereiro e de novembro a dezembro.

No Brasil, o consumo de jabuticaba começou com os índios que saboreavam esse fruto tanto na forma natural como fermentada. O nome vem do Tupi, *aiouti kaua*, que significa fruta de que se alimenta o jabuti ^{35,78-79}.



Figura 9: Foto ilustrativa da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) ⁸⁰.

A árvore possui normalmente 7,0 metros de altura, o tronco ramificado de casca fina e muito lisa, que se descama anualmente em placas. As folhas pequenas são avermelhadas quando novas. As flores são brancas e presas diretamente no caule e ramos. Os frutos são chamados bagas de até 3,0 cm de diâmetro; as cascas de avermelhada até quase preta com polpa branca, agri-doce, comestível, saborosa, com uma única semente ⁸¹.

Os frutos são consumidos *in natura* ou como geléias. A polpa fermentada produz licor. A casca é adstringente, útil contra diarreia e irritações da pele. A madeira é utilizada para utensílios domésticos pela elevada durabilidade ⁸¹.

CAPÍTULO 2:

OBJETIVOS

O presente trabalho foi realizado visando:

- Desenvolver procedimento para obtenção de extratos estáveis e com altos teores de ACYS a partir das frutas estudadas, em condições viáveis para adaptação e aplicação em escala industrial.

- Avaliar os diferentes métodos de quantificação de ACYS descritas na literatura para comparação de desempenho e elaboração de proposta de quantificação simplificada e custo reduzido, a fim de estabelecer um método para análises de rotina para controle de qualidade de extratos obtidos em escala industrial.

- Outro aspecto abordado no presente trabalho foi a obtenção de um concentrado de ACYS a partir dos extratos das frutas para uso nos diferentes métodos de quantificação nos quais diferentes solventes são empregados.

As frutas estudadas neste trabalho foram *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba), *Morus nigra* (amora) e *Rubus sp* (amora preta).

CAPÍTULO 3:

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Considerações Gerais

As frutas utilizadas neste trabalho foram *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba), *Morus nigra* (amora) e *Rubus sp* (amora preta). No caso, da jabuticaba, utilizou-se a fruta comercializada para consumo humano (referida neste texto como jabuticaba) e o refugo (assim referido neste texto), constituído de frutos não comercializáveis para consumo humano e que já sofreram degradação por intempéries da natureza como vento, chuva ou ataque de pássaros estando ainda fixados na jabuticabeira ou já caídos dela.

As duas espécies de amoras foram colhidas em uma fazenda na região de Botucatu (SP); a jabuticaba e o refugo foram colhidas em Casa Branca (SP).

Todas as frutas utilizadas foram fornecidas congeladas pela empresa Anidro do Brasil Extrações Ltda, responsável pela aquisição junto a produtores e pela identificação das espécies.

Para o início do trabalho, foram empregadas frutas colhidas no período de julho a novembro/2005, acondicionadas em frascos de 700 g e refrigeradas a $\sim -11^{\circ}\text{C}$ logo após a colheita. Para a segunda etapa de estudo, as frutas foram colhidas no período de julho a novembro/2006 e acondicionadas analogamente. O transporte foi realizado em caixas de isopor devidamente refrigeradas. Para realização dos experimentos, as porções necessárias de frutas eram removidas do freezer e mantidas a temperatura ambiente até degelo.

3.2. Reagentes, Materiais e Equipamentos

3.2.1. Reagentes:

Acetato de sódio anidro PA (Synth), acetonitrila 99,9 % (Merck), ácido acético glacial 99,7 % PA (Synth), ácido clorídrico PA (Synth), ácido fórmico 85 % PA (Synth), água corrente potável², água deionizada (deionizador MilliPore Milli-Q Plus), água destilada (destilador de vidro), álcool de cereais 93,8°INPM (EMFAL), carbonato de sódio anidro PA (Synth), citrato de sódio PA (Synth), , cloreto de potássio PA (Synth), etanol PA 99,5 % (Synth), fenoxietanol (Embrafarma), metanol grau HPLC (TEDIA), nipagim (Synth), nipazol (Synth), sorbato de potássio 98 % (Chenco), vermelho do Congo (VETEC).

² Informações de características físico-químicas e microbiológicas da água corrente empregada são apresentadas no ANEXO 1

3.2.2. Padrões de ACYS:

Cloreto de cianidina-3-galactosídeo ≥ 90 % HPLC (SIGMA), cloreto de cianidina-3-glicosídeo ≥ 95 % HPLC (SIGMA), cloreto de cianidina-3-rutinosídeo ≥ 98 % HPLC (SIGMA), cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo ≥ 90 % HPLC (SIGMA), cloreto de malvidina-3-glicosídeo ≥ 90 % HPLC (SIGMA), cloreto de pelargonidina (SIGMA), cloreto de pelargonidina-3-glicosídeo ≥ 97 % HPLC (SIGMA), cloreto de peonidina-3-glicosídeo ≥ 97 % HPLC (SIGMA).

3.2.3. Soluções de pH conhecido ajustadas com pHmetro^{49,82}:

- ❖ pH 1,0: cloreto de potássio (KCl) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ + ácido clorídrico (HCl) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$
- ❖ pH 2,0: citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ + ácido clorídrico (HCl) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$
- ❖ pH 3,4: citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ + ácido clorídrico (HCl) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$
- ❖ pH 4,5: acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ + ácido clorídrico (HCl) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$

3.2.4. Materiais e Equipamentos:

- ❖ **Medidas de pH:** pHmetro Analyser 300 e eletrodo de vidro Analion V620.
- ❖ **Extração:** Banho termostatizado Templette TE-8D Refrigerator Bath ESRB-11 Techne.
- ❖ **Medidas espectrofotométricas:** espectrofotômetro Biotech Pharmacia Ultrospech 2000, espectrofotômetro HP 8452A Diode Array e cubetas de quartzo 1,0 cm de caminho óptico (Q4-Biocel).
- ❖ **Armazenagem dos Extratos:** geladeira GE TMNF-E
- ❖ **Secagem dos Extratos:** evaporador rotativo RE 111 acoplado a banho termostatizado Büchi 461 Water Bath e capela laboratorial com vazão $0,6 \text{ m s}^{-1}$ com abertura de 28 cm^3 .
- ❖ **Centrifugação:** Centrifuga Exalsa II, Modelo 206 BL, FANEM, rotação 2000 RPM por 2 min.

³ Valores obtidos com Anemômetro LT Lutron, modelo AM-4202 em avaliação da Comissão de Segurança do Instituto de Química, conforme relatório apresentado no ANEXO 2.

- ❖ **Análises de HPLC:** Cromatógrafo Shimadzu Prominece coluna C18 (tipo ODS2, comprimento = 25,0 cm, diâmetro interno = 4,6 mm, tamanho de partícula = 5 µm e tamanho de poro = 100 Å, Varian, Microsorb MV) e detector com arranjo de diodos SPD-M20A.
- ❖ **Pesagem dos padrões de ACYS:** Balança Mettler Toledo AX205 Delta Range.

Toda vidraria volumétrica foi devidamente calibrada e quando necessário, foram realizadas as padronizações recomendadas pela literatura⁸³⁻⁸⁴.

Para otimização do processo de extração de ACYS das frutas, foram estudadas variáveis para obtenção de extratos brutos, visando maximizar a concentração de ACYS e a durabilidade dos extratos. Para isso, as extrações foram realizadas em diferentes solventes e temperaturas, variando-se a proporção fração da fruta fonte de ACYS : solvente, com frutas em diferentes condições e duas condições de armazenamento dos extratos.

3.3. Procedimentos Experimentais

3.3.1. Extração

Foram estudadas as seguintes variáveis: tipo de solvente extrator, temperatura de extração e proporção *massa da fração da fruta : volume do solvente* no caso da jabuticaba e do refugo para verificar a influência da polpa no processo de extração, pois se sabe que as ACYS concentram-se nas cascas desses frutos. Partiu-se da proporção 1:3 massa da fração de fruta:volume de solvente, otimizada por Terci⁴⁹. A quantidade inicial de massa de fruta ou massa da fração da fruta para preparação dos extratos foi da ordem de 30 g.

Os solventes extratores testados foram: água destilada, água corrente, etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v), álcool de cereais e etanol 94 %.

As extrações em solventes aquosos foram realizadas a 55°C por 30 minutos e a 25°C por 24 horas com solventes alcoólicos.

O desempenho dos procedimentos de extração foi avaliado em função da quantidade total de ACYS extraída, considerada proporcional à absorbância no comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de cada extrato. Este valor foi expresso em termos de porcentagem de ACYS presentes no extrato.

A alguns extratos obtidos em água corrente foram acrescentados conservantes (estruturas apresentadas na Figura 10): 0,25 % m/v de fenoxietanol, 0,20 % m/v de sorbato de potássio e uma combinação de 0,01 % m/v de nipagim + 0,05 % m/v de nipazol para estudo de seu efeito na estabilidade dos extratos.

Estes conservantes são de uso comum em extratos vegetais comercializados para fins alimentícios ou farmacêuticos e por isso foram utilizados neste estudo.

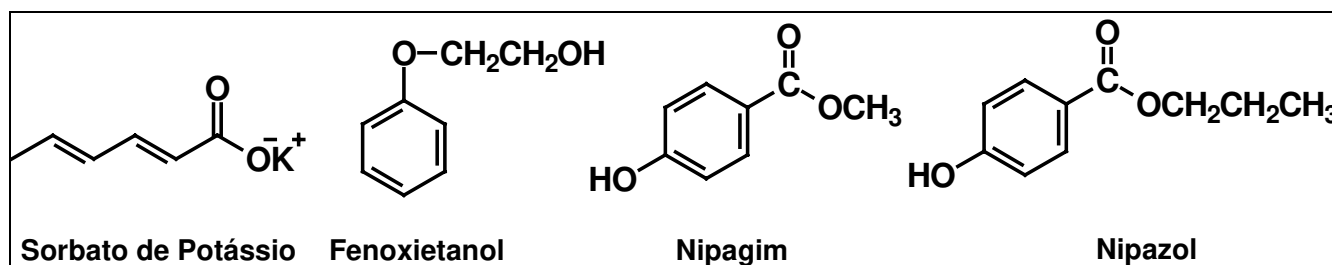


Figura 10: Estrutura dos conservantes utilizados nos estudos de estabilidade ⁸⁵⁻⁸⁷

Sorbato de Potássio (hexa-2,4-dienoato de potássio): É conservante de uso geral, sendo o sal mais comum por ser mais solúvel em água quando comparado ao ácido sórbico. Não se utiliza em associação com outros conservantes, sendo amplamente usado na indústria alimentícia como fungicida e bactericida. O sorbato de potássio é não-irritante e não-sensibilizante. Reações alérgicas são muito raras e ele é bem tolerado quando administrado internamente, toxicidade: LD 50 > 2000 mg/kg ⁸⁵⁻⁸⁷.

Fenoxietanol (2-fenoxi-1-etanol): Também não é utilizado em associação com outros conservantes e seu uso é devido à atividade antimicrobiana. Possui baixa toxicidade: LD50 oral > 1500 mg/kg ⁸⁵⁻⁸⁷.

Nipagin (metil 4-hidroxibenzoato) e Nipazol (propil 4-hidroxibenzoato):

Possuem amplo espectro de ação antimicrobiana, efetivos em baixas concentrações, baixa toxicidade. Quimicamente estáveis em solução aquosa, mantêm sua atividade de pH 4,0 a 8,0, porém possuem solubilidade reduzida em água, a qual pode ser aumentada com a temperatura. Geralmente são utilizados em conjunto. Também possuem baixa toxicidade, LD50 oral > 1500 mg/kg⁸⁵⁻⁸⁷.

❖ 3.3.1.1. Jabuticaba e Refugo

Antes do início dos testes de condições de extração de jabuticaba e refugo, foi realizado um estudo para estimar a porcentagem de casca na jabuticaba e no refugo. Esta informação seria considerada posteriormente para avaliação do efeito do uso da fruta inteira e de diferentes proporções casca:polpa no processo de extração. Este estudo foi realizado a partir da medida das massas das frutas inteiras e das cascas dessas frutas, em 5 replicatas das diferentes remessas.

Mantendo-se a proporção da fração de fruta:solvente 1:3 (m/v), mas considerando-se a porcentagem de cascas nas frutas, foram testadas as condições para extração apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições de extração testadas.

Condição	Proporção casca:polpa
I	apenas casca:solvente 1:3 (m/v) (fonte de ACYS 1:3 solvente)
II	casca + polpa:solvente 1:3 (m/v) (fonte de ACYS 1:~6 solvente)
III	casca + polpa:solvente ~2:3 (m/v) (fonte de ACYS 1:3 solvente)

Série 1: A primeira série de experimentos foi realizada utilizando-se 2 solventes extratores aquosos: água corrente* e água destilada.

As frutas foram descascadas manualmente utilizando-se luvas de látex (Descarpack) e as massas adequadas maceradas foram imersas nos solventes e aquecidas sem agitação a 55±1°C em banho termostatizado, por 30 minutos, seguindo-se filtração em papel de filtro qualitativo (Qualy, 14 mm) para posterior medida espectrofotométrica.

* Informações das características físico-químicas e microbiológicas da água corrente empregada são apresentadas no ANEXO 1.

Os procedimentos foram realizados em duplicata e toda a série de duplicatas foi repetida com frutas de remessas distintas.

Série 2: Utilizando-se jabuticaba e refugo, a segunda série de experimentos foi realizada com um novo conjunto de solventes extratores, sendo eles: água corrente, etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v), álcool de cereais e etanol 94 % nas condições I e III da Tabela 1 e os procedimentos foram realizados em triplicatas.

❖ **3.3.1.2. Amora e Amora Preta**

O processo da extração para as amoras foi realizado com a fruta inteira macerada, na proporção 1:3 fruta:solvente (m/v). Nestes testes, foram utilizados os seguintes solventes extratores: água corrente, etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v) e álcool de cereais.

Os procedimentos de extração foram realizados como descrito em 3.3.1., de acordo com o solvente extrator utilizado, seguindo-se filtração em papel de filtro qualitativo (Qualy, 14 mm) para posterior medida espectrofotométrica. Os procedimentos foram realizados em triplicata a partir da extração.

❖ **3.3.1.3. Verificação da perda de ACYS por “extração indireta”:**

Como já foi citado, as frutas foram recebidas e mantidas armazenadas em frascos plásticos de 700 g. Após o degelo para posterior utilização, observava-se um resíduo líquido de coloração característica das ACYS no fundo do frasco. Considerou-se este resíduo líquido como produto de uma “extração indireta”, devido ao contato das frutas com a água do degelo.

Com o objetivo de verificar a perda de ACYS nesse resíduo líquido, inicialmente, as cascas das jabuticabas contidas no frasco foram pesadas e, após uma extração utilizando-se água corrente como solvente extrator, estimou-se a quantidade de ACYS nessas cascas por medidas de absorbância no $\lambda_{\text{máx}}$ das ACYS.

Em seguida, a partir da quantidade de ACYS contida no resíduo líquido, também estimada por medidas de absorbância no mesmo comprimento de onda, foi calculada a perda de ACYS por “extração indireta”, discriminada no capítulo 4, item 4.1.3 (página 50).

3.3.2. Estabilidade

Os testes de estabilidade foram realizados variando-se a temperatura e o tempo de armazenamento. Para jabuticaba e refugo, também foi observada a influência do uso da polpa juntamente com as cascas na estabilidade do extrato.

Todos os extratos obtidos foram armazenados em frascos de vidro âmbar, metade armazenada à temperatura ambiente em armários escuros (T_{amb}), $\sim 25^{\circ}\text{C}$, e o restante armazenado sob refrigeração em geladeira (T_{refrig}) a $\sim 8^{\circ}\text{C}$.

Periodicamente, foram obtidos espectros eletrônicos de amostras dos extratos para verificação da degradação das ACYS, incluindo a observação de aparecimento de fungos e modificações na coloração avermelhada característica da solução das ACYS.

Nos casos onde houve aparecimento de fungos, o extrato era centrifugado e obtinha-se o espectro UV-VIS do sobrenadante. O monitoramento dos extratos era interrompido apenas quando se observava a perda da coloração avermelhada dos extratos.

Os extratos armazenados em T_{amb} foram monitorados em média durante 60 dias quando se observava a perda da coloração avermelhada característica das ACYS. Já os extratos armazenados a T_{refrig} foram monitorados em média por 300 dias.

❖ 3.3.2.1. Teste com Conservantes:

Extratos de casca de refugo obtidos com água corrente foram acrescentados de conservantes para estudo de seu efeito na estabilidade.

As cascas, na proporção 1:3 fruta:solvente (m/v), foram maceradas, imersas no solvente e levadas a aquecimento a 55°C , por 30 minutos, seguido de filtração simples com posterior adição dos conservantes ainda a quente para facilitar a solubilização dos mesmos.

Os espectros eletrônicos foram obtidos após resfriamento a T_{amb} . O armazenamento foi realizado a T_{refrig} por aproximadamente 150 dias.

3.3.3. Secagem dos Extratos

Foram testadas duas condições de secagem dos extratos a fim de obter produto de partida para quantificação de ACYS extraídas. O produto obtido foi uma pasta de alta viscosidade, que passou a ser chamado de “extrato seco de ACYS”.

No primeiro teste, massas e volumes conhecidos de extratos recém preparados foram colocados em placas de Petri e mantidos sob o sistema de exaustão da capela com vazão de $0,6 \text{ m s}^{-1}$ à T_{amb} até massa constante. No segundo teste, massas e volumes conhecidos de extratos foram colocados em um balão de fundo redondo de 1 L e levados ao rotaevaporador com banho termostatizado a 25°C até atingir massa constante.

Os extratos secos na capela foram monitorados por 66 horas, porém a partir de 22 horas de secagem não foram observadas mudanças significativas nas massas dos mesmos, com obtenção de $\sim 2,5 \text{ g}$.

Os extratos secos no rotaevaporador foram monitorados por 100 horas quando foi observada massa do sistema constante ($\sim 45 \text{ g}$), porém não foi observada a obtenção do extrato seco de ACYS, ou seja, de um material de alta viscosidade. O material obtido possuía ainda muito solvente.

Os extratos secos de ACYS utilizados foram armazenados em placas de Petri fechadas e envolvidas com papel alumínio, sendo mantidas em freezer a -11°C para uso posterior nas análises de quantificação.

3.3.4. Quantificação

Após a otimização do processo de extração e de armazenamento, o trabalho foi focalizado na quantificação total de ACYS, partindo-se de 3 propostas da literatura, os métodos: de Petri/Krawczyk/Kéry⁵⁹, de Sondheimer & Kertesz⁶⁰ e do pH diferencial (Fuleki & Francis e Giusti & Wrolstad)^{61-62, 64} e algumas adaptações no método do pH diferencial.

O método oficial AOAC International para quantificação de ACYS⁶⁵ é baseado no método do pH diferencial e nas transformações sofridas pelas ACYS em diferentes pHs⁶⁵.

Aplicou-se HPLC com uso de padrões de ACYS para comparação dos resultados dos métodos espectrofotométricos^{59-62,64}. Os padrões de ACYS foram adquiridos de acordo com dados de Terci⁴⁹ e Dugo & colaboradores⁸⁸, porém se sabe que a composição das ACYS nas frutas pode ser alterada por diversos fatores discutidos no Capítulo 1.

A proposta de uso de HPLC com padrões de ACYS, além de servir para comparação com os resultados obtidos pelos métodos espectrofotométricos e suas adaptações para quantificação de ACYS total, também representou opção tentativa para quantificar individualmente as ACYS presentes em cada fruta estudada.

As soluções dos padrões de ACYS utilizadas para o estudo com HPLC também foram utilizadas para um estudo com espectrofotometria UV-VIS, descrito em 3.3.5 (página 41).

❖ **3.3.4.1. Método de Petri/Krawczyk/Kéry⁵⁹ (P):**

É um método espectrofotométrico que utiliza o padrão de cloreto de pelargonidina dissolvido em HCl 0,1 mol L⁻¹ em metanol para construção da curva analítica. Foi preparada uma solução estoque, dissolvendo-se 3,12 mg de cloreto de pelargonidina em um balão volumétrico de 10,0 mL com HCl 0,1 mol L⁻¹ em metanol e a curva analítica foi construída adicionando-se 60; 100; 140; 180; 240 e 350 µL da solução estoque em balões volumétricos de 5,00 mL, completando-se o volume com HCl 0,1 mol L⁻¹ em metanol.

As amostras de extratos secos das frutas (~30 mg) foram dissolvidas em HCl 0,1 mol L⁻¹ em metanol em balões volumétricos de 100,0 mL e a absorbância foi medida em 522 nm, $\lambda_{\text{máx}}$ deste padrão.

❖ **3.3.4.2. Método de Sondheimer & Kertesz⁶⁰ (S):**

O método de Sondheimer e Kertesz é baseado na utilização do indicador vermelho do Congo dissolvido em carbonato de sódio 5,0 10⁻³ mol L⁻¹ para construção da curva analítica com medidas de absorbância em 500 nm.

Foi preparada uma solução estoque do indicador vermelho do Congo dissolvendo-se 2,10 mg em um balão volumétrico de 100,0 mL com Na₂CO₃ 5,0 10⁻³ mol L⁻¹. Para a construção da curva analítica, volumes adequados da solução estoque foram adicionados em balões volumétricos de 5,0 mL, completando-se o volume final com a solução de Na₂CO₃ 5,0 10⁻³ mol L⁻¹.

Posteriormente, foi necessária a obtenção de um fator de ajuste a partir de uma solução de cloreto de pelargonidina de concentração igual a $312,31 \text{ mg L}^{-1}$. Foram preparadas duas diluições a partir de $250 \mu\text{L}$ desta solução estoque de pelargonidina diluídos para $5,0 \text{ mL}$ em balão volumétrico com solução tampão de pH 2,0 e 3,4, para medida da absorbância em 500 nm .

Amostras com cerca de 120 mg de extratos secos foram dissolvidas em água deionizada em balões volumétricos de 10 mL . Alíquotas de $500 \mu\text{L}$ foram transferidas para balões volumétricos de $5,0 \text{ mL}$ e diluídas com soluções tampão pH 2,0 e 3,4 para posterior medida espectrofotométrica.

❖ **3.3.4.3. Método de Fuleki & Francis (F)** ^{61-62,64}

Trata-se do método conhecido como método do pH diferencial (**F**), fundamentado nas transformações sofridas pelas ACYS com a variação do pH, ou seja, as diferentes estruturas correspondentes às diferentes colorações das soluções em diferentes pHs. Além disso, como alguns extratos de frutas podem apresentar material em suspensão, causando espalhamento de luz, o método recomenda leitura de absorbância em comprimento de onda onde não há absorção referente às ACYS (700 nm), além daquele onde ocorre absorção.

As amostras de extratos secos das frutas ($\sim 60 \text{ mg}$) foram dissolvidas em água deionizada em balões volumétricos de $5,0 \text{ mL}$ e diluídas com soluções pH 1,0 e pH 4,5 também em balões volumétricos de $5,0 \text{ mL}$ e as leituras de absorbância foram realizadas em 510 nm e 700 nm (**FC**). A *Equação 1* foi usada para calcular as absorbâncias usadas no cálculo das concentrações de ACYS (página 59).

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

onde: A é o valor da absorbância medida e o *subíndice* refere-se ao comprimento de onda da leitura.

❖ **3.3.4.4. Método Oficial (FC)** ⁶⁵

O método oficial ⁶⁵ é baseado no método do pH diferencial de Fuleki & Francis, descrito em 3.3.4.3, considerando as transformações estruturais sofridas pelas ACYS em diferentes pHs. As medidas também são realizadas em pH 1,0 e 4,5 e em 510 nm ($\lambda_{\text{máx}}$ das ACYS nesses pHs) e em 700 nm para correção de possível espalhamento de luz.

❖ 3.3.4.5. Adaptações no método do pH diferencial:

Como o método do pH diferencial fundamenta o método oficial para quantificação de ACYS em extratos de frutas, optou-se por testar algumas adaptações visando simplificá-lo para facilitar sua implementação em aplicação de rotina industrial.

Primeiramente, foi realizado um estudo para verificar o efeito da leitura de absorbância em 700 nm na quantificação das ACYS, eliminando-a dos cálculos (**FS**) e aplicando-se a *Equação 2* para obtenção da absorbância a ser usada para calcular a concentração de ACYS.

$$A = (A_{510\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{510\text{nm}})_{\text{pH}4,5} \quad \textbf{Equação 2}$$

onde: A = valor da absorbância medida num dado comprimento de onda (subíndice) num valor de pH.

Verificou-se também a possibilidade de redução dos valores de pH para as medidas, optando-se por testar o resultado das medidas apenas em pH 1,0.

As amostras (~60 mg) de extratos secos das frutas foram dissolvidas em solução pH 1,0 e as leituras foram realizadas em 510 nm e 700 nm (**F1C**). O método simplificado utilizando medidas em pH 1,0 e absorbância apenas no $\lambda_{\text{máx}}$ dos extratos foi chamado de **F1S** e as absorbâncias usadas para cálculos das concentrações por **F1C** e **F1S** foram obtidas pela aplicação das *Equações 3 e 4* respectivamente.

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} \quad \textbf{Equação 3}$$

$$A = (A_{510\text{nm}})_{\text{pH}1,0} \quad \textbf{Equação 4}$$

onde: A = valor da absorbância medida num dado comprimento de onda (subíndice) num valor de pH.

Também foi verificado o uso direto da absorbância no $\lambda_{\text{máx}}$ do extrato em soluções sem ajuste de pH para associar com a concentração de ACYS. Amostras (~60 mg) de extratos secos das frutas foram dissolvidas em água deionizada e as medidas realizadas em 510 nm (**FAS**), considerando-se as absorbâncias dadas pelas *Equações 5 e 6* (neste caso, desconsiderando a correção em 700 nm, **FAC**) para calcular a concentração de ACYS.

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{sem ajuste de pH}} \quad \textbf{Equação 5}$$

$$A = (A_{510\text{nm}})_{\text{sem ajuste de pH}} \quad \textbf{Equação 6}$$

onde: A = valor da absorbância medida num dado comprimento de onda (subíndice) sem ajuste de pH.

❖ **3.3.4.6. Análises dos Extratos por HPLC** ⁴⁸:

Para os procedimentos por HPLC, foram empregadas as condições de solubilização de extratos secos de ACYS, otimizadas por Sampaio e Rossi ⁸⁹: dissolução em metanol com 0,1% HCl e diluição adequada no mesmo solvente para posterior injeção no cromatógrafo nas seguintes condições:

- fase móvel = água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v ^{48,90}
- vazão da fase móvel = 1,0 mL min⁻¹ com eluição isocrática e em fase reversa
- volume de injeção = 20 µL
- detecção em 520, 525 e 540 nm
- tempo de eluição = 40 min

Para a quantificação dos extratos de ACYS por HPLC é necessária uma etapa prévia de identificação das ACYS presentes em cada fruta estudada. Goiffon/Mouly/Gaydou ⁹⁰ desenvolveram um método para identificação de ACYS que dispensa o uso de padrões comerciais e relaciona o tempo de retenção (t_R) das ACYS presentes nos extratos das frutas com o t_R da cianidina-3-glicosídeo, comumente presente em todas as frutas.

Posteriormente, para os estudos de quantificação de ACYS total e individuais por HPLC foram utilizados 8 padrões de ACYS. Curvas analíticas foram obtidas a partir da dissolução de 0,00030 g dos padrões em metanol com 0,1% HCl e volumes adequados foram injetados no cromatógrafo nas condições descritas acima.

Para a quantificação de ACYS nas frutas, massas conhecidas (~0,0600 a 0,1000 g) de extratos secos de ACYS foram solubilizadas em metanol com 0,1% HCl, filtradas em filtros com porosidade de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo nas mesmas condições utilizadas para os padrões, sem etapa de purificação por extração em fase sólida com cartucho C18.

3.3.5. Quantificação espectrofotométrica de ACYS individuais:

Utilizando-se soluções 40 mg L^{-1} dos padrões de ACYS em metanol com 0,1 % HCl m/v foram obtidos espectros UV-VIS a fim de se avaliar a viabilidade de quantificação espectrofotométrica de ACYS individuais. Estes espectros também serviram para verificar a influência de grupos metoxilas e hidroxilas presentes nas diferentes antocianinas no comprimento de onda de absorção máxima de suas respectivas soluções.

CAPÍTULO 4:

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ACYS têm espectros com absorção típica entre 465 e 550 nm conforme pode ser observado na Figura 11, onde são apresentados espectros dos extratos obtidos em água corrente das frutas estudadas neste trabalho. Na região do ultravioleta, as absorções estão relacionadas com outros compostos presentes nos extratos, como ácidos fenólicos e taninos⁹¹⁻⁹².

O comprimento de onda de absorção máxima na região do visível foi utilizado como parâmetro de comparação para estimativa da concentração de ACYS nos extratos nos testes de condições de extração e nos monitoramentos de estabilidade.

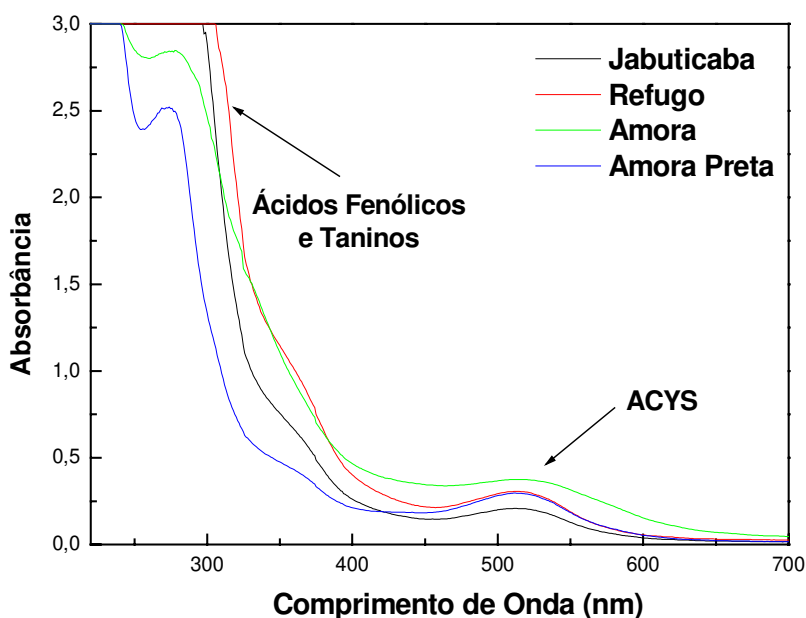


Figura 11: Espectros de extratos de jabuticaba, refugo, amora e amora preta obtidos em água corrente como solvente extrator na proporção 1:3 massa de fruta:volume de solvente, utilizando água corrente como branco.

4.1. Otimização de condições de extração de ACYS

Os procedimentos de extração de ACYS das frutas visaram aspectos desejáveis para aplicação industrial como: alta concentração de ACYS nos extratos, simplicidade, baixa toxicidade do solvente extrator e baixo custo.

❖ **4.1.1. Jabuticaba e Refugo**

Os estudos realizados com jabuticaba e refugo para estimar a porcentagem de cascas nesses frutos mostraram que nas amostras de jabuticaba, 40 ± 5 % em massa, correspondiam à casca e para as amostras de refugo esse valor foi de 51 ± 5 % m/m.

Considerando esses resultados, foram realizados testes para verificar a influência da utilização da casca juntamente com a polpa, em diferentes proporções (Tabela 1), no processo de extração e também na estabilidade dos extratos, discutida em **4.2** (página 51).

Série 1: Considerando-se desejável a maior quantidade de ACYS extraídas, com boa repetibilidade, os melhores resultados foram obtidos na extração com água corrente na condição III: casca+polpa na proporção 1:3 casca:solvente (m/v) (Tabela 2). Porém, o prosseguimento do trabalho foi realizado na condição I devido a maior estabilidade dos extratos obtidos, quando comparada à condição III como é discutido em **4.2** (página 51).

Tabela 2: Valores médios de absorbância em $\lambda_{\text{máx}}$ (514 nm) dos extratos das frutas nas diferentes condições de extração* e solventes (água corrente e água destilada).

Condições de Extração	JABUTICABA		REFUGO	
	Água Corrente	Água Destilada	Água Corrente	Água Destilada
I	$1,4 \pm 0,1$	$1,63 \pm 0,07$	$0,94 \pm 0,04$	$1,1 \pm 0,2$
II	$0,9 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$	$0,63 \pm 0,05$	$0,48 \pm 0,02$
III	$1,60 \pm 0,03$	$2,1 \pm 0,5$	$1,22 \pm 0,08$	$0,9 \pm 0,1$

*Descritas na Tabela 1 (página 33).

Comparando-se os resultados da extração com água corrente e água destilada, não foi observada diferença estatística com nível de confiança de 95 % (teste *t Student* pareado⁹³ - ANEXO 3). Sendo assim, optou-se pelo prosseguimento dos trabalhos, utilizando-se apenas água corrente por questões de simplicidade e menor custo, já que a proposta visa aplicação industrial.

Comparando-se os resultados da extração de ACYS da jabuticaba e do refugo, notou-se que os extratos obtidos com refugo apresentaram em média 40 % menos ACYS.

Uma segunda série de experimentos utilizando um novo conjunto de solventes extratores foi realizada. Solventes alcoólicos foram testados, pois, de acordo com a literatura^{11,19,27,38,48-49}, favorecem a extração das ACYS, exercendo um papel relevante em intumescer as cascas e/ou frutas, o que facilita a remoção dos pigmentos da sua fonte.

Foram estudados 3 solventes alcoólicos: etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v), álcool de cereais (etanol 94 % (m/m)) e etanol 94 %. A escolha desses solventes foi baseada na obtenção de extratos mais concentrados de ACYS e menor toxicidade dos solventes visando aplicação industrial.

Após alguns experimentos com *Morus nigra* e *Rubus sp* utilizando apenas os dois primeiros solventes citados, introduziu-se o uso de etanol 94 % devido a sua toxicidade reduzida frente a outros solventes extratores mais eficientes que podem ser utilizados, como metanol e acetona, e que é bastante empregado industrialmente em extrações análogas.

Série 2: Para verificar qual solvente alcoólico levava à obtenção de extratos mais concentrados de ACYS, foi definido um parâmetro denominado **desempenho da extração, D**, definido na *Equação 7* e expresso em porcentagem. Considerou-se como 100 % a quantidade de ACYS extraída para os extratos aquosos, estimada a partir de medidas de absorbância no $\lambda_{\text{máx}}$ de cada extrato.

$$D = \frac{A_{\lambda_{\text{alc}}}}{A_{\lambda_{\text{aq}}}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

onde: $A_{\lambda_{\text{alc}}}$ = absorbância do extrato alcoólico em $\lambda_{\text{máx alc}}$ e $A_{\lambda_{\text{aq}}}$ = absorbância do extrato aquoso em $\lambda_{\text{máx aq}}$. Para extratos alcoólicos $\lambda_{\text{máx alc}} = 538$ a 540 nm e para extratos aquosos $\lambda_{\text{máx aq}} = 512$ a 515 nm.

A Figura 12 ilustra os espectros de extratos de jabuticaba e de refugo nos diferentes solventes extratores utilizados obtidos apenas com cascas como fontes de ACYS.

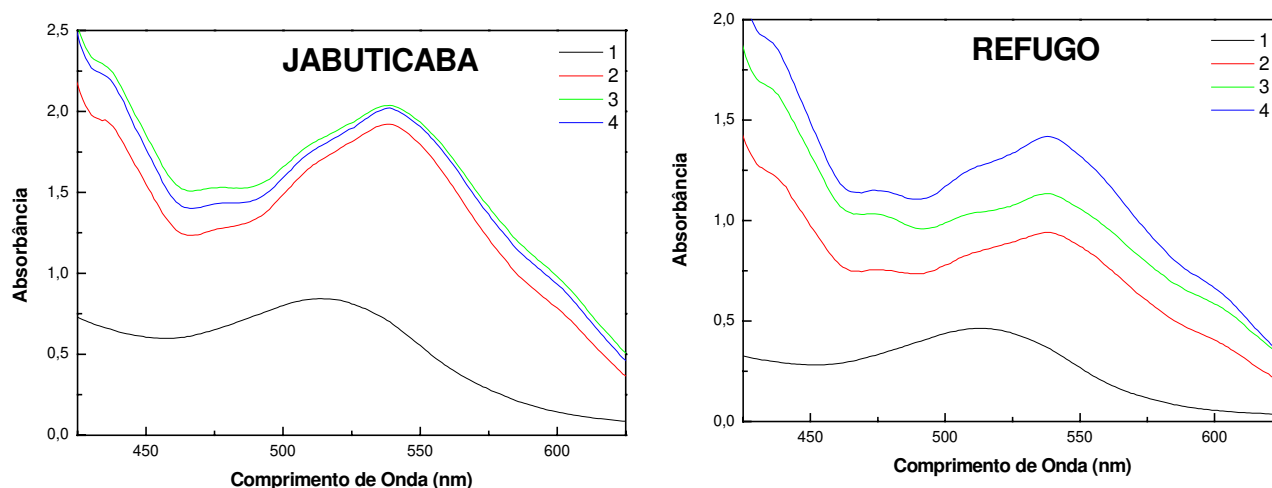


Figura 12: Espectros médios dos extratos de jabuticaba e refugo em diferentes solventes de extração: 1) água corrente, 2) etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v), 3) álcool de cereais e 4) etanol 94 % a partir de extratos preparados na proporção 1:3 fruta:solvente (m/v) apenas com as cascas. Os solventes extratores foram utilizados como branco.

No caso da jabuticaba (apenas casca) a extração com solventes alcoólicos produziu extratos nos quais a quantidade de ACYS foi 3 vezes maior em comparação com extratos obtidos com o solvente aquoso. Já a extração usando casca+polpa produziu extratos 2 vezes mais concentrados.

Para o refugo, tanto usando casca como casca+polpa, a extração alcoólica forneceu extratos 1,5 vezes mais concentrados. A Tabela 3 traz os resultados médios obtidos.

Tabela 3: Desempenho da extração de ACYS (%) com solventes alcoólicos, para jabuticaba e refugo, considerando 100 % a quantidade de ACYS extraídas com água corrente.

Condição Solvente	Jabuticaba		Refugo	
	Casca	Casca+Polpa	Casca	Casca+Polpa
etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v)	287±19	207±19	125±18	118±24
álcool de cereais	327±31	198±11	123±21	165±7
etanol 94 %	299±46	151±6	154±12	149±6

Desempenho da extração aquosa considerado 100 %

Dentre os solventes alcoólicos na mesma condição de extração os resultados obtidos não diferiram significativamente com nível de confiança de 95 %.

A partir desses resultados, as novas extrações passaram a ser realizadas utilizando-se apenas cascas como fonte de ACYS e etanol 94 % como solvente extrator. Usar somente a casca para a extração também aumentou a estabilidade do extrato como é discutido em 4.2.1. (página 52).

❖ 4.1.2. Amora e Amora Preta

A Figura 13 ilustra espectros dos extratos de amoras nos diferentes solventes.

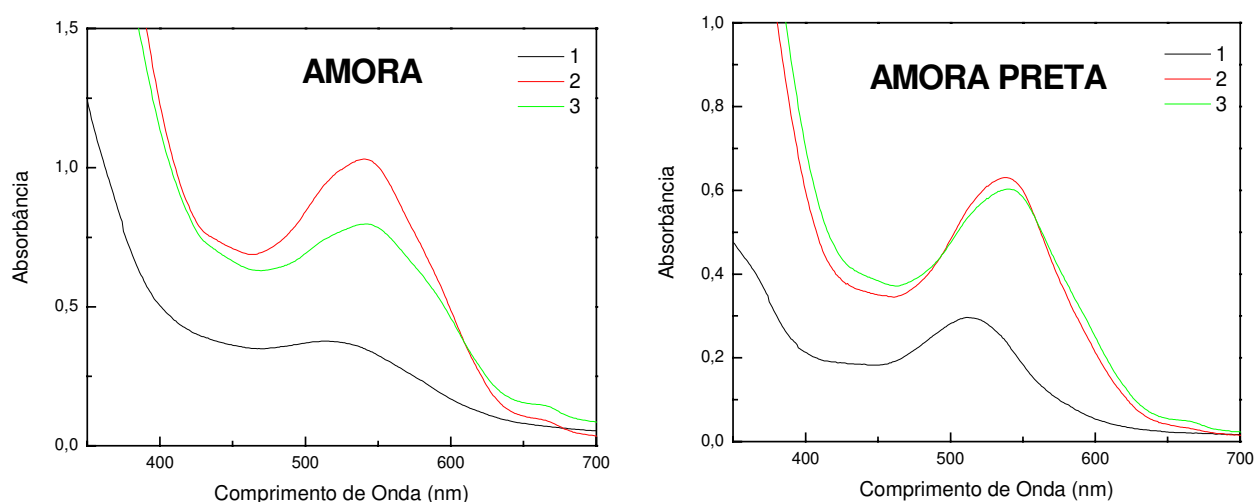


Figura 13: Espectros médios dos extratos de amora e amora preta em diferentes solventes de extração: 1) água corrente, 2) etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v) e 3) álcool de cereais a partir de extratos preparados na proporção 1:3 fruta:solvente (m/v). Os solventes extratores foram utilizados como branco.

Observa-se, pela Figura 13, que extratos mais concentrados de ACYS foram obtidos com etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v), seguido por extratos com álcool de cereais e com água corrente (os menos concentrados), considerando-se mesmas massas de partida (~30 g de fruta).

O mesmo parâmetro de **desempenho da extração** utilizado para jabuticaba e refugo (4.1.1, página 46) foi utilizado a fim de se verificar qual solvente produz extratos mais concentrados em ACYS.

Os resultados (Tabela 4) indicaram que os solventes alcoólicos permitiram obter extratos com cerca do dobro de ACYS em comparação com o solvente aquoso.

Tabela 4: *Desempenho da extração* dos solventes alcoólicos, para as 2 espécies de amoras, considerando 100 % a extração obtida em água corrente.

Solvente	Desempenho da Extração (%)	
	<i>Amora</i>	<i>Amora Preta</i>
etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v)	252±40	206±12
álcool de cereais	212±10	189±23

Desempenho da extração aquosa considerado 100 %

O solvente que forneceu extratos mais concentrados de ACYS, foi etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v). Foram realizados os testes estatísticos descritos no *ANEXO 3* e não houve diferença significativa com 95 % de confiança entre o desempenho da extração com cada um dos 2 solventes alcoólicos para as duas espécies de amoras.

❖ **4.1.3.Verificação da perda de ACYS por “extração indireta”:**

O resíduo líquido restante no frasco de armazenamento das frutas apresentava coloração característica de extratos de ACYS, o que foi confirmado pelo espectro visível apresentado na Figura 14, sem indícios de degradação em 12 meses de armazenamento em T_{refrig} , sendo isto verificado em função de medidas espectrofotométricas e aspecto visual, ou seja, aparecimento de fungos e alteração na coloração.

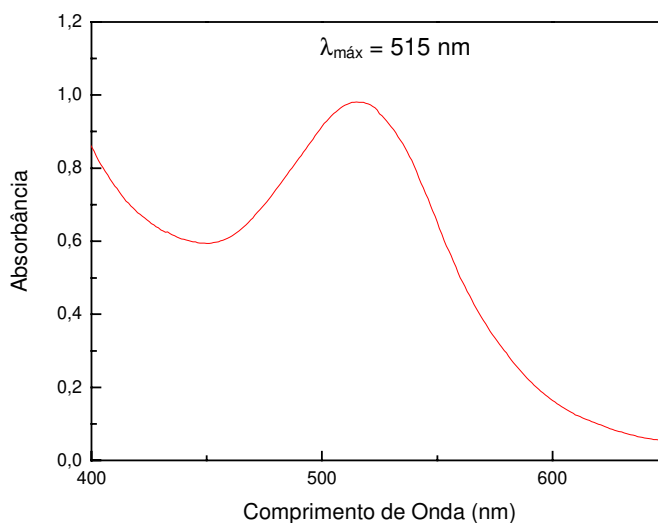


Figura 14: Espectro do resíduo líquido restante no frasco de jabuticaba utilizando água corrente como branco.

Para estimar a perda de ACYS por “extração indireta”, **ExInd**, definida na *Equação 8* em termos percentuais, foi realizada uma extração aquosa a 55°C por 30 minutos como descrito em **3.3.1.** (página 31), utilizando-se as frutas contidas no frasco e mediu-se a absorbância do extrato em 515 nm. A leitura de absorbância do resíduo líquido restante diretamente sem diluição também foi feita em 515 nm, para comparação e estimativa de **ExInd**.

$$ExInd = \frac{A_{\lambda} \text{ Resíduo}}{A_{\lambda} \text{ Extrato}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

onde: A_{λ} = absorbância medida em $\lambda_{\text{máx}}$ do extrato das frutas

A perda estimada de ACYS por “extração indireta” foi de 12±6 %. Em termos de aplicação industrial, esta perda por extração indireta acima de 10 % não pode ser considerada desprezível. Portanto, o aproveitamento desse resíduo líquido restante nos frascos de armazenamento pode ser significativo. Como não foi observada degradação desse resíduo líquido, pode-se sugerir seu aproveitamento no processo de obtenção de extrato. Vale ressaltar que este experimento foi realizado poucas vezes devido à disponibilidade de material.

4.2. Testes de estabilidade dos extratos de ACYS

A estabilidade dos extratos de ACYS foi avaliada por inspeção visual (coloração típica das ACYS e aparecimento de fungos) e pelos espectros eletrônicos.

Para a maioria das condições testadas (tipos de extração e frutas), observou-se um aumento na absorbância do extrato em 30 dias de armazenamento. Isto pode estar relacionado com alguns fenômenos como: auto-associação, copigmentação, quelação com metais e ação de microorganismos. Esses fenômenos podem causar aumento na absorbância do extrato além de alterações no $\lambda_{\text{máx}}$ ⁹⁴, sem estar diretamente relacionados com a quantidade de ACYS presentes nos extratos, fornecendo resultados superestimados.

❖ **4.2.1. Jabuticaba e Refugo**

Foi observado o aparecimento de fungos nos extratos aquosos das jabuticabas armazenados tanto à T_{amb} quanto T_{refrig} a partir de 15 dias após sua obtenção.

O monitoramento foi interrompido em 60 dias, quando foi observado total descoramento da solução. Nesse período, notou-se degradação de 54 ± 15 % das ACYS dos extratos de jabuticaba e 52 ± 16 % para extratos de refugos mantidos à T_{amb} .

Para extratos mantidos a T_{refrig} , a degradação no mesmo período (60 dias) foi 26 ± 13 % para extratos de jabuticaba e 34 ± 19 % para extratos de refugos. Esses extratos foram preparados utilizando-se somente casca para a extração.

Os extratos alcoólicos de jabuticaba e refugo apresentaram maior estabilidade quando comparados aos extratos aquosos, tanto aqueles armazenados em T_{amb} quanto aqueles armazenados à T_{refrig} . Quando se utilizou apenas casca para extração, obteve-se uma maior estabilidade em comparação com extratos obtidos com casca+polpa.

Para os extratos alcoólicos de jabuticaba armazenados à T_{amb} por 270 dias, foi observada uma degradação de ~45 % quando utilizado apenas casca para extração e ~50 % quando utilizado casca+polpa sendo estes armazenados durante 150 dias. Já para os extratos armazenados à T_{refrig} a degradação observada foi de até 10 % para extratos obtidos com apenas casca e de até 25 % para aqueles obtidos com casca+polpa durante um período de 420 dias de armazenamento.

Para os extratos alcoólicos de refugo, a deterioração ocorreu em um período 3 vezes menor. Isto pode ser explicado pela maior exposição desses frutos, com rompimento de casca, por exemplo, à ação de microorganismos que contribuem para a degradação dos extratos.

Vale lembrar que jabuticabas são altamente perecíveis apresentando um curto período de comercialização após a colheita devido ao elevado teor de água, açúcares e enzimas que aceleram processos de degradação⁹⁵⁻⁹⁶.

Usar apenas cascas para extração é vantajoso em comparação ao uso de casca+polpa, tanto para jabuticaba como para refugo, pois evita a extração de outros compostos presentes nas polpas, como açúcares, que também podem favorecer a ação de microorganismos e a degradação das ACYS.

Os resultados obtidos utilizando-se álcool de cereais e etanol 94 % não apresentaram diferença significativa com nível de confiança de 95 % quando se considerou a degradação dos extratos.

Os extratos preparados com esses solventes apresentaram menor degradação quando comparados àqueles obtidos com água corrente e etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v). A partir desses resultados, os próximos estudos foram realizados utilizando-se apenas casca e etanol 94 % para obtenção de extratos.

❖ 4.2.2. Amora e Amora Preta

Comparando-se a estabilidade dos extratos das duas espécies de amoras, num período de 15 dias de armazenamento, notou-se que os extratos aquosos degradaram mais rapidamente que os extratos alcoólicos, como seria esperado. Além disso, houve aparecimento de fungos nos extratos armazenados à T_{amb} o que indicou outra desvantagem na utilização desse solvente.

Nesse mesmo período, não foi observado o aparecimento de fungos para os extratos alcoólicos, mantidos na mesma temperatura.

Comparando-se etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v) e álcool de cereais como solventes extratores, apenas para extratos de amora preta armazenados à T_{refrig} apresentaram resultados com diferença estatisticamente significativa com 95 % de confiança (Tabela 5), ou seja, a degradação foi maior quando se utilizou etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v) como solvente.

Tabela 5: Valores de degradação % das ACYS nos extratos de amora e amora preta.

<i>Solventes</i> <i>Extratores</i>	Degradação das ACYS (%)			
	T_{amb}		T_{refrig}	
	AMORA	AMORA PRETA	AMORA	AMORA PRETA
etanol:ácido acético 1 % (v/v) 85:15 (v/v)	56±8	69±2	22±17	13±4
álcool de cereais	64±1	66±1	22,4±0,3	0,4±0,2

❖ **4.2.3. Teste com Conservantes:**

Para os primeiros extratos obtidos em água corrente sem adição de conservantes, foi observado o aparecimento de fungos nos 15 primeiros dias de armazenamento, tanto à T_{amb} quanto T_{refrig} .

Na tentativa de minimizar a ação dos fungos e aumentar a durabilidade dos extratos, foi realizado um teste com uso de conservantes de uso comum em processos industriais para fins alimentícios^{85-87,97}.

Com o conjunto nipagin+nipazol foi observada uma degradação de 57 ± 4 % e para fenoxietanol uma degradação de 49 ± 4 % em 300 dias de armazenamento, sendo que estes resultados não diferem significativamente com nível de confiança de 95 %. Porém, quando se utilizou sorbato de potássio, observou-se a total degradação das ACYS após 30 dias de armazenamento, provavelmente devido à ação desse conservante como uma base de Lewis, o que pode ter favorecido à formação de chalconas a partir das ACYS.

4.3. Secagem dos Extratos

Foram realizadas medidas periódicas da *massa do sistema*^{*} até obtenção de massa constante. Os perfis de secagem obtidos para o refugo nas duas condições estudadas estão apresentados nas Figuras 15 e 16.

Após cerca de 22 horas, foi obtida massa constante nos extratos submetidos a secagem sob exaustão da capela. No rotoevaporador, só depois de 100 horas a massa do sistema ficou constante. Provavelmente, a falta de troca atmosférica no rotaevaporador leva a um equilíbrio após certo período de secagem, que dificulta a evaporação do solvente, enquanto que nas placas de Petri, além de maior área superficial, ocorre constante troca atmosférica na capela por exaustão, o que facilita a remoção do solvente, acelerando a secagem dos extratos.

* massa do sistema = massa do solvente + massa de extrato seco

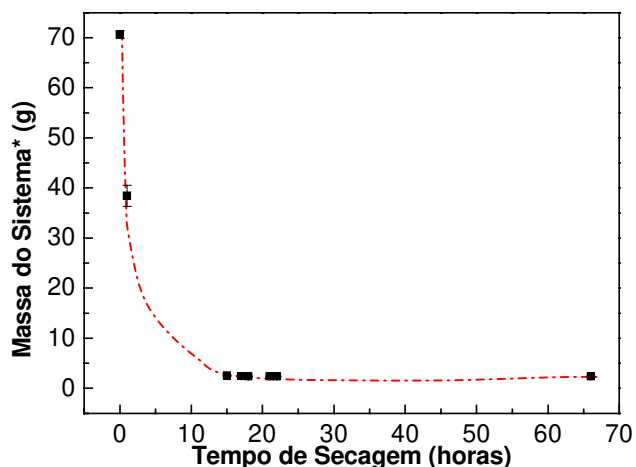


Figura 15: Perfil de secagem dos extratos na capela a 25°C para o Refugo.

* *massa do sistema* = massa do solvente + massa de extrato seco

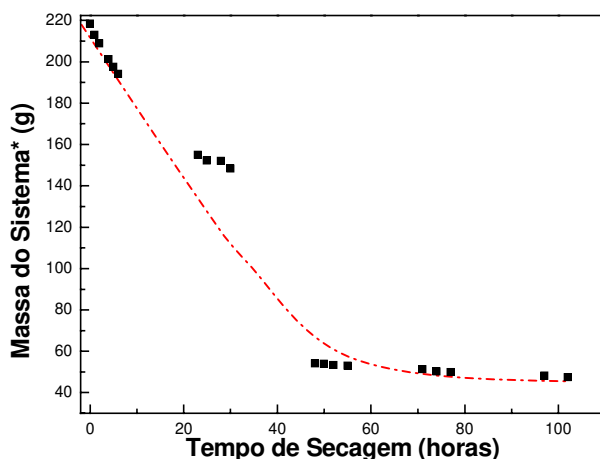


Figura 16: Perfil de secagem dos extratos no rotaevaporador a 25°C para o Refugo.

* *massa do sistema* = massa do solvente + massa de extrato seco

Os resultados dos diferentes métodos de secagem estudados apontaram a melhor adequação da secagem sob exaustão em capela dos extratos a temperatura ambiente, que permite obter o “extrato seco” de ACYS em menor tempo, reduzindo a exposição dos extratos a variações de temperatura, luz e oxigênio do ambiente. Visto que esses fatores comprometem a estabilidade dos extratos de ACYS, optou-se pelo processo de obtenção dos “extratos secos” sob exaustão em capela à temperatura ambiente.

4.4. Quantificação das ACYS

A quantificação de ACYS totais foi realizada pela aplicação de diferentes métodos espectrofotométricos descritos na literatura^{59-62,64}, inclusive o método oficial⁶⁵ e o testes de adaptações de procedimentos, a fim de comparação dos resultados, buscando procedimento simplificado e válido.

❖ 4.4.1. Método de Petri/Krawczyk/Kéry⁵⁹ (P):

A curva analítica (Figura 17) obtida para este método com médias de 5 replicatas utilizando o padrão cloreto de pelargonidina (Figura 18) é descrita pela *Equação 9* e apresentou um coeficiente de regressão linear = 0,9998.

$$A_{522\text{nm}} = (1,38 \times 10^{-3}) + (9,91 \times 10^{-2} C_{\text{cloreto de pelargonidina}}) \quad \text{Equação 9}$$

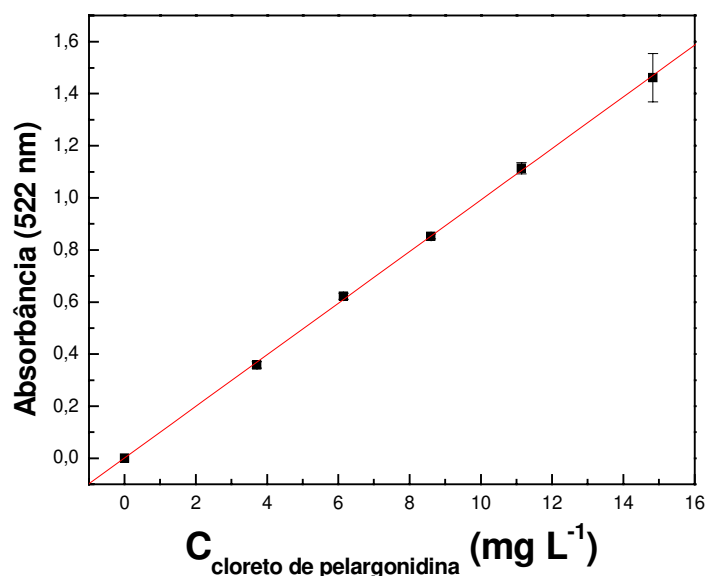


Figura 17: Curva analítica para quantificação de ACYS total pelo método de Petri/Krawczyk/Kéry.

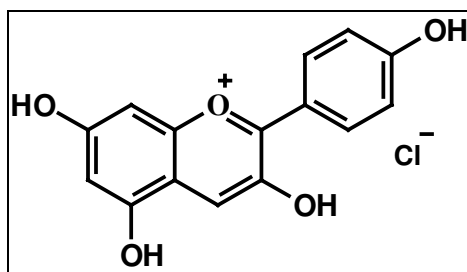


Figura 18: Estrutura do padrão Cloreto de Pelargonidina.

❖ 4.4.2. Método de Sondheimer & Kertesz⁶⁰ (S):

Este método foi o primeiro método fundamentado nas transformações estruturais sofridas pelas ACYS em diferentes pHs. A quantificação é realizada a partir de medidas de absorbância no $\lambda_{\text{máx}}$ dos extratos em pH 2,0 e 3,4.

A Figura 19 ilustra a curva analítica obtida com médias de 5 replicatas usando o corante vermelho do Congo (estrutura na Figura 20) e é descrita pela *Equação 10* e apresentou um coeficiente de regressão linear = 0,9999.

$$A_{500\text{nm}} = (5,24 \times 10^{-3}) + (3,60 \times 10^{-2} C_{\text{Vermelho do Congo}}) \quad \text{Equação 10}$$

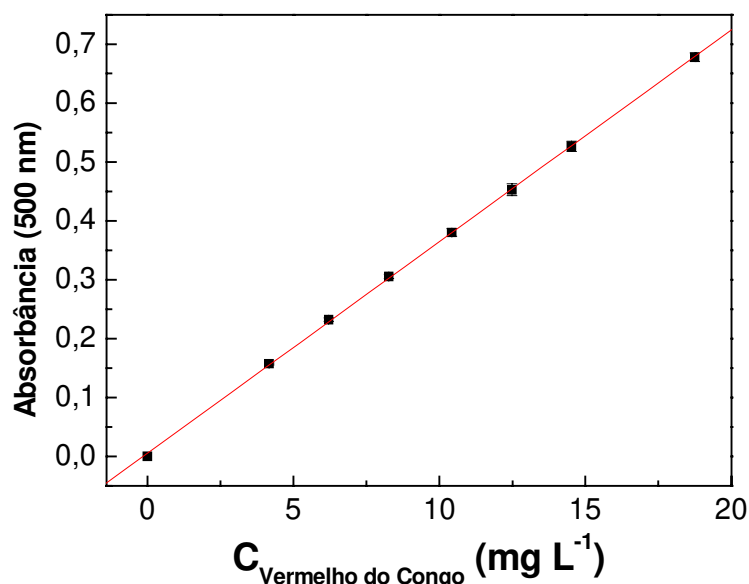


Figura 19: Curva analítica obtida pelo método de Sondheimer & Kertesz utilizando o corante vermelho do Congo.

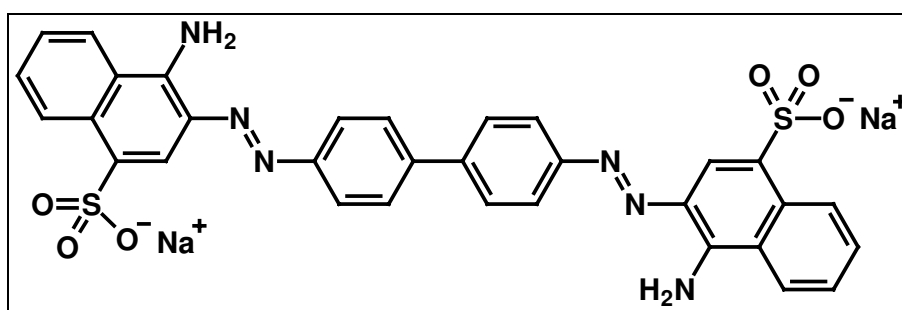


Figura 20: Estrutura do corante vermelho do Congo.

O corante Vermelho do Congo pode ser usado como padrão para quantificação de ACYS, pois apresenta intensa absorção na mesma região do visível, além de apresentar absorvidade molar semelhante. Porém, é necessária a determinação de um **fator de ajuste (FA)** da concentração obtida para os extratos de frutas (*Equação 11*).

FA é obtido utilizando-se uma solução do padrão cloreto de pelargonidina com concentração conhecida comparada com a concentração determinada pela curva analítica em função do vermelho do Congo. O valor do fator de ajuste determinado foi igual a 1,14.

$$FA = \frac{C_{PA}}{C_{VC}} \quad \text{Equação 11}$$

onde: FA=Fator de Ajuste, C_{PA} =Concentração do Padrão de Cloreto de Pelargonidina em mg L^{-1} , C_{VC} =Concentração do corante Vermelho do Congo em mg L^{-1} .

❖ 4.4.3 Método de Fuleki & Francis^{61-62,64}(F):

O método desenvolvido por Fuleki & Francis, conhecido como método do pH diferencial, é fundamentado nas transformações estruturais sofridas pelas ACYS em diferentes pHs, resultando em diferentes espectros de absorção. O cátion flavílico, de coloração fortemente vermelha, é a forma predominante em pH 1,0 e o carbinol, que é incolor, é a forma predominante em pH 4,5^{1,20}. Portanto a diferença da absorbância nos diferentes pHs é proporcional à concentração de ACYS.

A concentração de ACYS nas amostras de frutas estudadas é obtida em função do padrão cloreto de cianidina-3-glicosídeo (Figura 21) ($\epsilon = 26900 \text{ g mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em pH 1,0 e solução aquosa)⁹⁸⁻⁹⁹, pois é a antocianina predominante na maioria das frutas, inclusive jabuticaba e amoras¹. A concentração em mg de ACYS por 100 g de fruta é dada pela *Equação 12* para as duas espécies de amora e pela *Equação 13* para a jabuticaba e o refugo, deduzidas por Fuleki e Francis a partir de considerações da Lei de Beer^{61-62,64}.

$$Ct = \frac{59,6 \times me \times A}{mp \times mc}$$

Equação 12

$$Ct = \frac{46,4 \times me \times A}{mp \times mc}$$

Equação 13

onde: Ct = concentração de ACYS (mg de ACYS/ 100 g de fruta); A = Absorbância (**item 3.3.4.3**); me = massa (g) do extrato seco obtido após extração; mp = massa (g) do extrato seco usada para preparo da solução; mc = massa (g) de fruta usada no processo de extração.

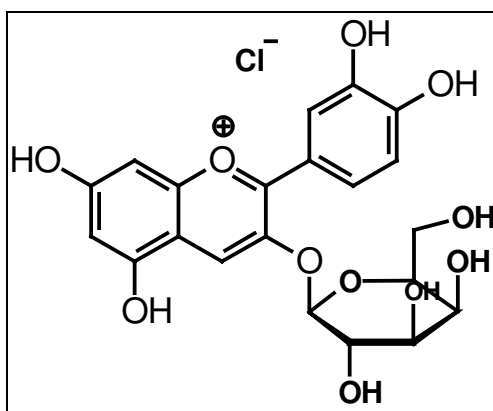


Figura 21: Estrutura do padrão Cloreto de Cianidina-3-glicosídeo.

❖ 4.4.4. Método Oficial (FC) ⁶⁵:

O método oficial segue os mesmos parâmetros utilizados por Fuleki & Francis, sendo as medidas de absorbâncias em 510 e 700 nm realizadas em pH 1,0 e 4,5. A medida em 700 nm é introduzida para em alguns extratos de frutas corrigir efeitos de espalhamento devido a suspensões coloidais; neste comprimento de onda a correção é tida como eficiente e não ocorre absorção das ACYS.

Como o método oficial é fielmente baseado no método de Fuleki & Francis os resultados foram juntamente designados por **FC**, que significa medidas em pH 1,0 e 4,5 e com medidas em 510 e 700 nm.

❖ 4.4.5. Adaptações no método do pH diferencial:

A primeira simplificação realizada foi verificar a influência da medida em 700 nm e indicada por **FS**: medida em 2 pHs e apenas em 510 nm.

A simplificação seguinte foi realizar medidas apenas em pH 1,0, pois é neste pH que o cátion flavílico é predominante. Dois experimentos foram realizados, utilizando medidas em apenas 510 nm (**F1S**) e medidas em 510 e 700 nm (**F1C**).

Para **FAC** (510 e 700 nm) e **FAS** (510 nm), as adaptações realizadas com medidas diretas de absorbância de extratos em soluções sem ajuste de pH, os cálculos da concentração de ACYS totais (*Equação 14*) devem ser corrigidos utilizando-se a absortividade molar da cianidina-3-glicosídeo ($\epsilon = 5920 \text{ g mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em pH ~4,1 e solução aquosa)⁹⁸⁻⁹⁹ correspondente ao solvente utilizado e ao pH da solução⁹⁸⁻⁹⁹, pois esta é uma característica particular de cada substância e do meio em que esta se encontra.

$$Ct = \frac{151,8 \times me \times A}{mp \times mc} \quad \text{Equação 14}$$

onde: Ct = concentração de ACYS (mg de ACYS/ 100 g de fruta); A = Absorbância (**item 3.3.4.5**); me = massa (g) do extrato seco obtido após extração; mp = massa (g) do extrato seco usada para preparo da solução; mc = massa (g) de fruta usada no processo de extração.

Os resultados obtidos para todas as frutas pelos diferentes métodos espectrofotométricos e suas adaptações estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Concentração de ACYS nas amostras das frutas estudadas, expressa em termos de cianidina-3-glicosídeo.

Métodos	Concentração das Amostras (mg ACYS / 100 g de fruta)			
	AMORA	AMORA PRETA	JABUTICABA	REFUGO
P	133±2	57±2	35±1	25±1
S	146±1	75±1	38±1	23±1
FC	123±3	60±5	29±1	19±1
FS	122±2	63±6	31±1	21±1
F1C	147±2	74±2	35,9±0,4	26,7±0,4
F1S	153±3	83±2	40,0±0,2	31,8±0,6
FAC	121±5	123±7	63±1	66±5
FAZ	141±6	152±7	79±3	95±1

Comparando-se os resultados obtidos pelos métodos espectrofotométricos estudados com o método oficial (**FC**) e realizando-se testes estatísticos⁹³ com 95 % de confiança, foi observada diferença estatística significativa apenas para os métodos que utilizaram soluções sem ajuste de pH dos extratos de amora preta, jabuticaba e refugo. Isto confirmou a necessidade de ajuste de pH do extrato para manter as ACYS na forma de cátion flavílico.

Por outro lado, a correção com a medida de absorbância em 700 nm não trouxe resultados com diferença estatística, indicando que nos casos de soluções, como as testadas presentemente, não é necessário realizar as medidas em 2 comprimentos de onda diferentes.

Sendo assim, a utilização do método **F1S**, com medidas de absorbância em pH = 1,0 no comprimento de onda de absorção máxima é o mais adequado para aplicação industrial, pois apresenta características de simplicidade, rapidez nas medidas e baixo custo de análises.

❖ 4.4.6. Análises dos Extratos por HPLC

Nesta parte do trabalho, foi aplicado o método Goiffon/Mouly/Gaydou⁹⁰ para identificação de ACYS a serem posteriormente quantificadas. Este método propõe a identificação de ACYS individuais presentes nos extratos sem o uso de padrões, o que pode ser questionado¹⁰⁰, mas se justifica neste caso devido à dificuldade de aquisição de padrões comerciais.

A proposta consiste no cálculo de α , um parâmetro empírico que relaciona o tempo de retenção (t_R) das ACYS presentes nos extratos das frutas com o t_R da cianidina-3-glicosídeo, comumente presente em todas as frutas, como indica a *Equação 15*. A comparação de $\alpha_{\text{calculado}}$ com valores de α_{tabelado} pelos autores permite identificar a antocianina em questão.

$$\alpha = \frac{t'_R}{t'_{R \text{ cianidina-3-glicosídeo}}}$$

Equação 15

onde: $t'_R = t_R - t_0$, t_R = tempo de retenção do produto, t_0 = tempo de retenção de um produto não retido.

As Tabelas 7 a 10 mostram as ACYS cuja presença nas frutas era esperada de acordo com informações da literatura ^{49,88} e aquelas identificadas nas amostras dos extratos dessas frutas a partir do método de Goiffon/Mouly/Gaydou ⁹⁰.

Tabela 7: ACYS encontradas em jabuticaba de acordo com a literatura e presentemente identificadas nas amostras dos extratos aplicando o método de Goiffon/Mouly/Gaydou.

Literatura	Goiffon/Mouly/Gaydou
Delfinidina-3-glicosídeo	Petunidina-3-glicosídeo
Cianidina-3-glicosídeo	Cianidina-3-glicosídeo
Peonidina-3-glicosídeo	Cianidina-3-sambubiosídeo

Tabela 8: ACYS encontradas em refugo de jabuticaba de acordo com a literatura e presentemente identificadas nas amostras dos extratos aplicando o método de Goiffon/Mouly/Gaydou.

Literatura	Goiffon/Mouly/Gaydou
Delfinidina-3-glicosídeo	Petunidina-3-arabinosídeo
Cianidina-3-glicosídeo	Cianidina-3-glicosídeo
Peonidina-3-glicosídeo	Petunidina-3-glicosídeo
-	Cianidina-3-sambubiosídeo

Tabela 9: ACYS encontradas em amora de acordo com a literatura e presentemente identificadas nas amostras dos extratos aplicando o método de Goiffon/Mouly/Gaydou.

Literatura	Goiffon/Mouly/Gaydou
Cianidina-3-glicosídeo	Cianidina-3-glicosídeo
Cianidina-3-soforosídeo	Cianidina-3-soforosídeo
Cianidina-3-rutinosídeo	Cianidina-3-sambubiosídeo
Pelargonidina-3-glicosídeo	Cianidina-3-arabinosídeo
Pelargonidina-3-rutinosídeo	Petunidina-3-galactosídeo
-	Delfinidina-3-glicosídeo

Tabela 10: ACYS encontradas em amora preta de acordo com a literatura e presentemente identificadas nas amostras dos extratos aplicando o método de Goiffon/Mouly/Gaydou.

Literatura	Goiffon/Mouly/Gaydou
Cianidina-3-arabinosídeo	Cianidina-3-arabinosídeo
Cianidina-3-glicosídeo	Cianidina-3-glicosídeo
Cianidina-3-galactosídeo	Cianidina-3-sambubiosídeo
Pelargonidina-3-glicosídeo	Delfinidina-3-glicosídeo
Cianidina-3-xilosídeo	Cianidia-3-sambubiosídeo-5-glicosídeo
Malvidina-3-glicosídeo	-

Notam-se diferenças nas ACYS identificadas nas amostras quando se compararam os dados da literatura com os resultados obtidos a partir da análise dos extratos presentemente obtidos, aplicando-se o método de Goiffon/Mouly/Gaydou⁹⁰. Como já apontado anteriormente, mesmas espécies podem apresentar diferentes ACYS devido a fatores de ordem genética e ambiental, como: condições de cultivo, tempo de plantio, exposição à luz UV e método de colheita. Vale ainda comentar-se sobre a identificação pelo método de Goiffon/Mouly/Gaydou.

Estudos de identificação de ACYS realizados por Sampaio¹⁰⁰, utilizando inclusive o método de Goiffon/Mouly/Gaydou⁹⁰, apontaram alguns problemas do método que prejudicam sua aplicação: duas ACYS diferentes são identificadas com mesmo α_{tabelado} e, em alguns casos, $\alpha_{\text{calculado}}$ pode apresentar um valor intermediário aos valores de α_{tabelado} , sendo necessário a confirmação da identidade das ACYS por outro método ou técnica.

A despeito desses aspectos relativamente problemáticos para identificação de ACYS, essas informações orientaram a aquisição de 8 padrões de ACYS disponíveis no mercado, visando aplicação nas análises por HPLC, iniciando-se pela obtenção dos tempos de retenção que seriam utilizados na posterior identificação e quantificação das ACYS individuais dos nos extratos das frutas estudadas. A Tabela 11 descreve os tempos de retenção obtidos a partir desses padrões.

Tabela 11: Tempo de retenção (t_r) dos padrões de ACYS.

Padrão	t_r (minutos)
Cloreto de pelargonidina	11,302
Cloreto de Malvidina-3-glicosídeo	34,140
Cloreto de Pelargonidina-3-glicosídeo	15,874
Cloreto de Cianidina-3-galactosídeo	8,141
Cloreto de Cianidina-3-glicosídeo	9,505
Cloreto de Cianidina-3,5-diglicosídeo	5,195
Cloreto de Cianidina-3-rutinosídeo	11,142
Cloreto de Peonidina-3-glicosídeo	21,972

Nos experimentos de HPLC com padrões de ACYS, foram obtidos alguns cromatogramas com dois picos próximos referentes ao mesmo padrão como mostra a Figura 22 que traz o cromatograma do padrão cloreto de cianidina-3-galactosídeo $20,0 \text{ mg L}^{-1}$. Isso pode ser explicado por provável hidrólise ácida do cátion flavílico após a adição de HCl em quantidade que pode ter sido excessiva e certamente traz complicações para o processo analítico. Nesse contexto, não foi possível diretamente a quantificação individual das ACYS presentes nos extratos das frutas estudadas por HPLC.

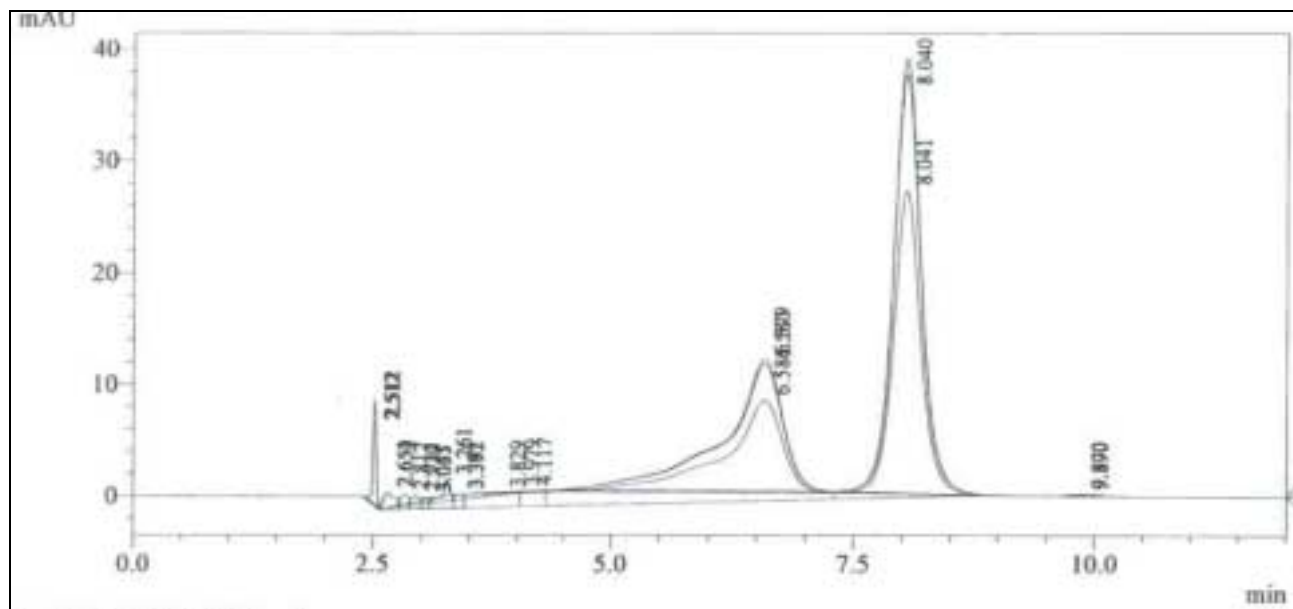


Figura 22: Cromatograma do padrão cloreto de cianidina-3-galactosídeo $20,0 \text{ mg L}^{-1}$. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 (v/v/v); volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção espectrofotométrica em 520, 525 e 540 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

Para tentar contornar o problema, realizou-se um estudo com adições do padrão de cianidina-3-glicosídeo numa amostra disponível de extrato seco de jabuticaba para construir a curva analítica para determinação da concentração dessa antocianina na amostra.

Na seqüência, estabeleceu-se uma correlação entre a área do pico correspondente à cianidina-3-glicosídeo e a concentração obtida dessa antocianina com a área dos outros picos do cromatograma, correspondente às demais ACYS presentes no extrato. A partir dessas correlações, obteve-se a concentração de ACYS total na jabuticaba. Posteriormente, a partir de correlações análogas às descritas para jabuticaba, foi obtida a concentração de ACYS total nas outras frutas.

As correlações e cálculos para obtenção da quantidade de ACYS total nas frutas estudadas estão apresentados pela *Equação 16*.

$$C_{ACYS_{individual}} = \frac{\text{Área do pico}_{ACYS_{individual}} \times C_{\text{cianidina-3-glicosídeo}}}{\text{Área do pico}_{\text{cianidina-3-glicosídeo}}} \quad \textbf{Equação 16}$$

Para encontrar as concentrações totais de ACYS nas frutas em mg ACYS / 100 g de fruta, foram utilizadas correlações entre massa total de extratos secos, massa de extratos secos utilizados para preparo das soluções, massa de frutas utilizadas para preparo dos extratos secos e as concentrações de ACYS obtidas a partir da *Equação 16* para cada fruta.

Para testar esta proposta, foi feita a adição de padrão de cianidina-3-glicosídeo numa amostra disponível de extrato seco de jabuticaba. Obteve-se a curva analítica, descrita pela *Equação 17* e apresentada na Figura 23, correlacionando a área do pico com a concentração dessa antocianina, com coeficiente de regressão linear = 0,9960.

$$\text{Área} = (1,15 \times 10^6) + (5,18 \times 10^4 C_{\text{cianidina-3-glicosídeo}}) \quad \textbf{Equação 17}$$

Seguindo este procedimento, encontrou-se que a amostra de jabuticaba continha 22,2 mg L⁻¹ de cianidina-3-glicosídeo. Por comparação com as áreas do outro pico do cromatograma (Figura 24) obteve-se que a quantidade de ACYS total na jabuticaba era de 25,1 mg L⁻¹.

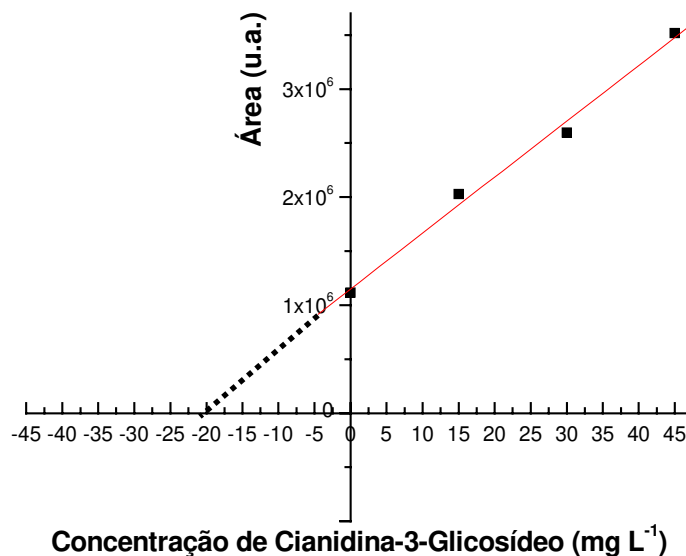


Figura 23: Curva analítica com adição de padrão de cianidina-3-glicosídeo numa amostra de jabuticaba.

Optou-se por aplicar esta extrapolação para encontrar a concentração de ACYS nas demais frutas, a partir dos cromatogramas de seus extratos devidamente diluídos e tratados. As Figuras 24 a 27 descrevem os cromatogramas obtidos utilizados para esses cálculos.

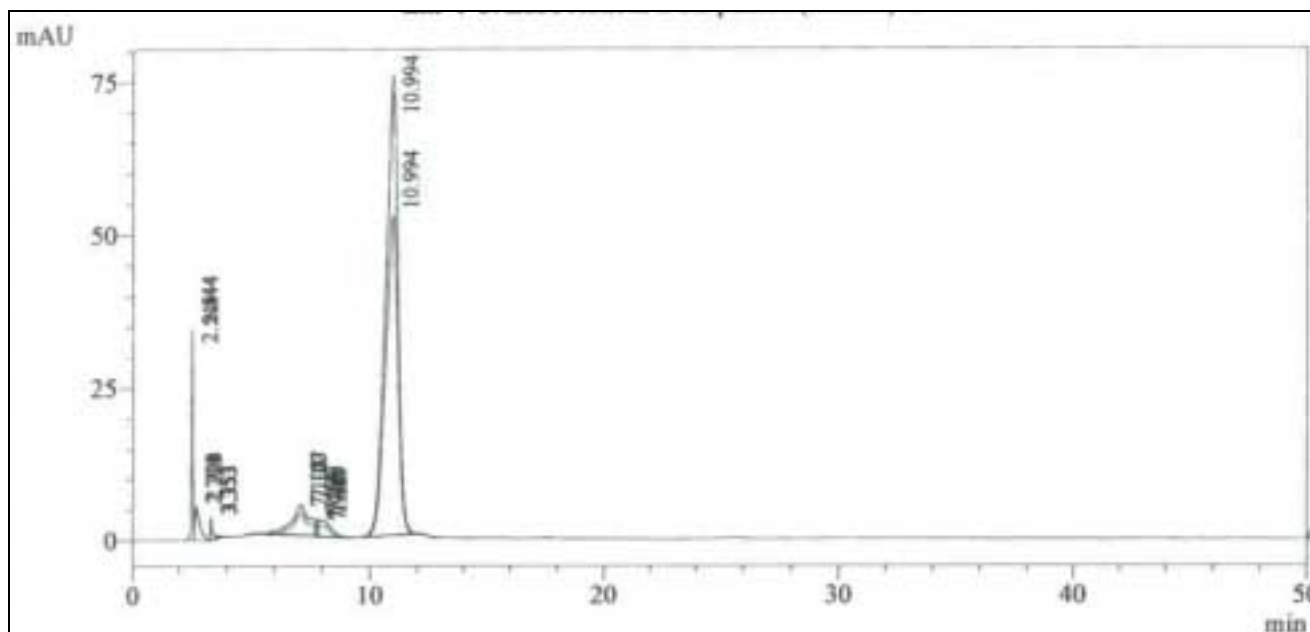


Figura 24: Cromatograma obtido a partir da amostra de extrato seco de jabuticaba em HCl 0,1 % (v/v). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 (v/v/v); volume de injeção 20 μ L e detecção espectrofotométrica em 520, 525 e 540 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

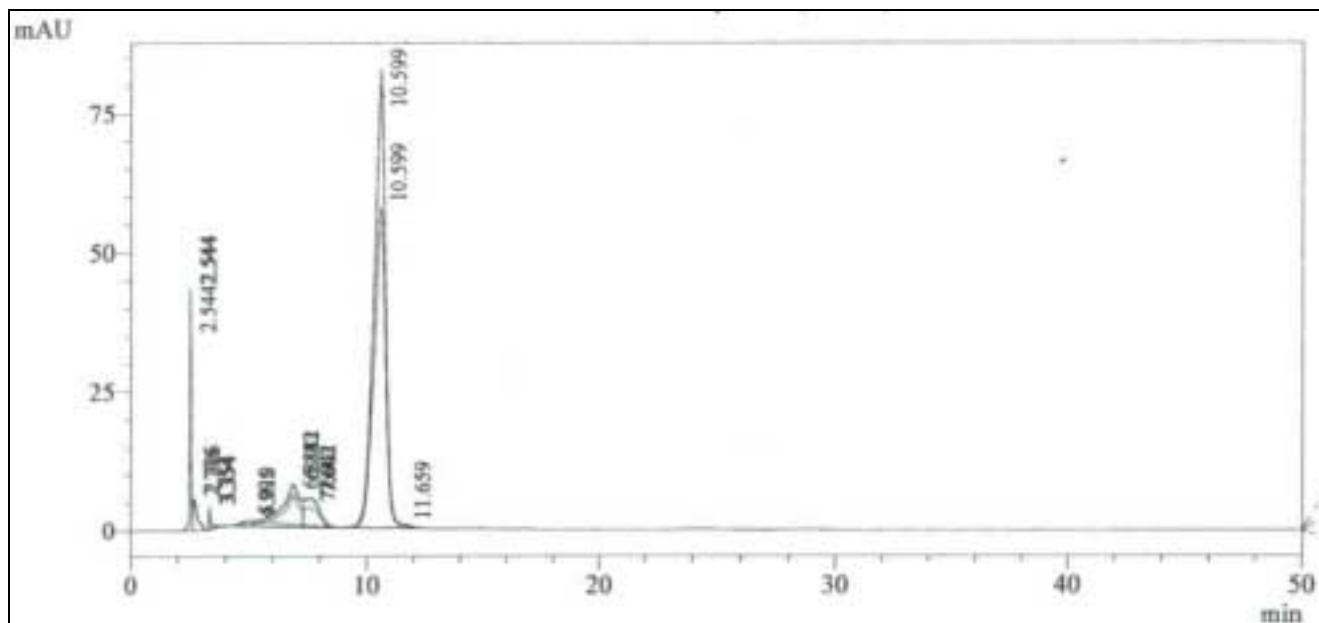


Figura 25: Cromatograma obtido a partir da amostra de extrato seco de refugio em HCl 0,1 % (v/v). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 (v/v/v); volume de injeção 20 μ L e detecção espectrofotométrica em 520, 525 e 540 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

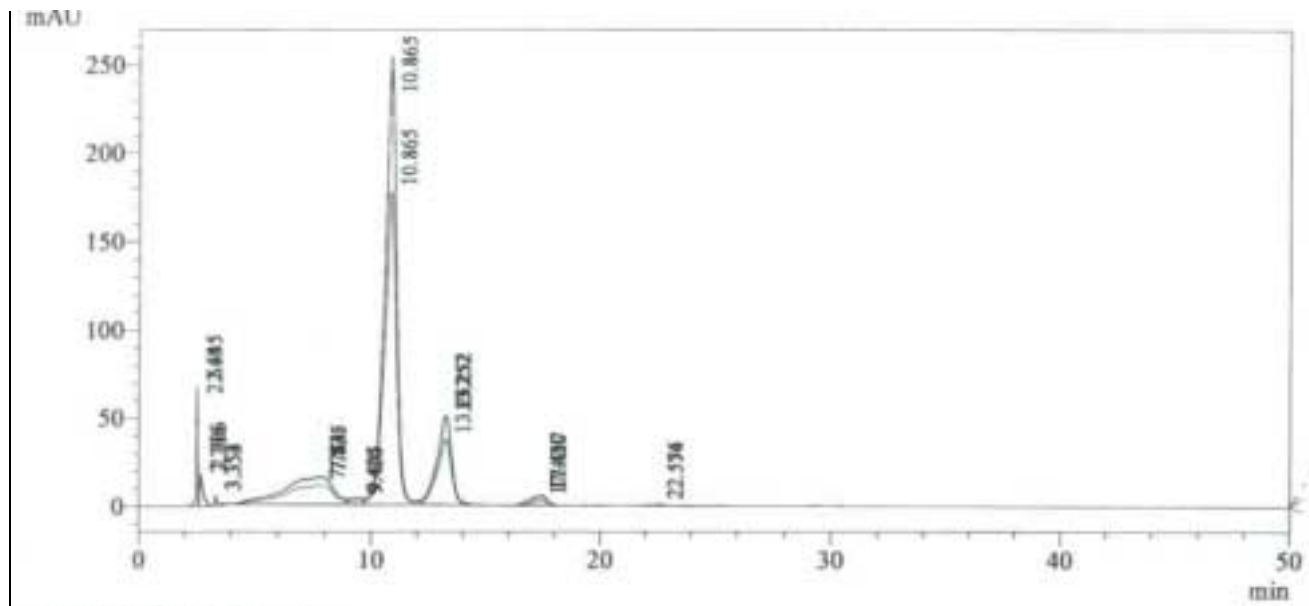


Figura 26: Cromatograma obtido a partir da amostra de extrato seco de amora em HCl 0,1 % (v/v). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 (v/v/v); volume de injeção 20 μ L e detecção espectrofotométrica em 520, 525 e 540 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

Isto aponta a pertinência das considerações propostas para a quantificação por HPLC que, ao contrário da espectrofotometria, requer uma etapa de identificação prévia de ACYS. Isto certamente introduz dificuldades no procedimento, mas, por outro lado, abre espaço para quantificação individual das ACYS presentes, o que pode ser de interesse em alguns casos.

4.5. Quantificação espectrofotométrica de ACYS individuais:

Os espectros UV-VIS de soluções dos padrões comerciais de ACYS 40 mg L⁻¹ em metanol com HCL 0,1 % v/v estão apresentados na Figura 28.

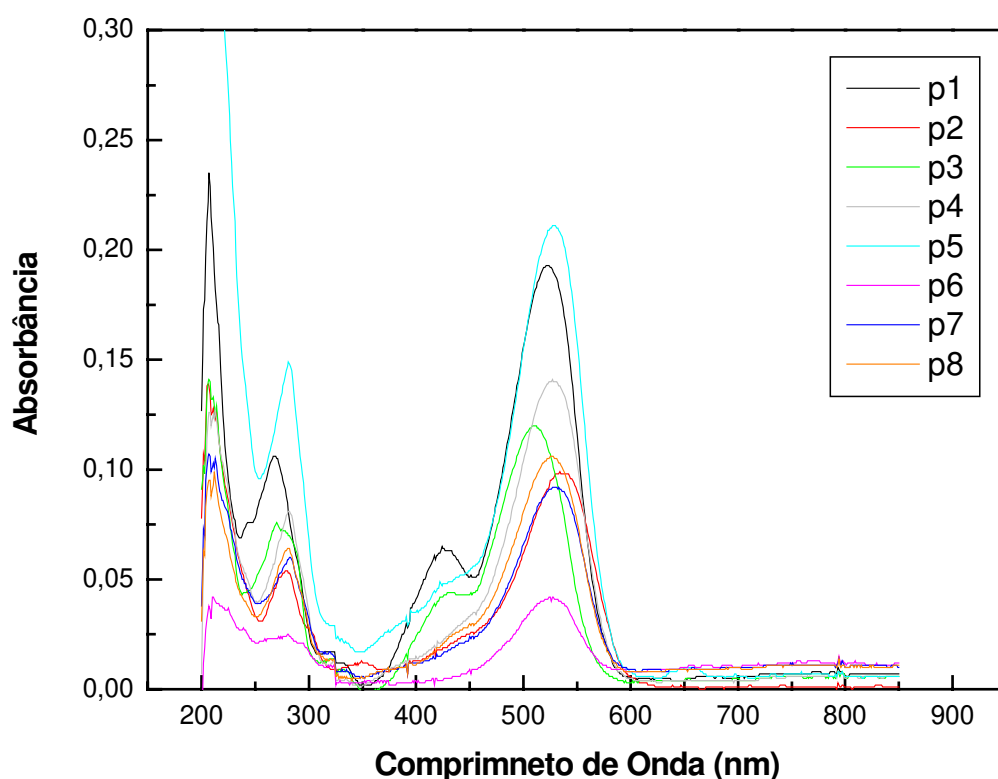


Figura 28: Espectros UV-VIS das soluções dos padrões comerciais de ACYS 40 mg L⁻¹ em metanol com HCL 0,1 % (v/v) utilizados no presente trabalho. p1: cloreto de pelargonidina, p2: cloreto de malvidina-3-glicosídeo, p3: cloreto de pelargonidina-3-glicosídeo, p4: cloreto de cianidina-3-galactosídeo, p5: cloreto de cianidina-3-glicosídeo, p6: cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo, p7: cloreto de cianidina-3-rutinosídeo e p8: cloreto de peonidina-3-glicosídeo. Branco: metanol com HCL 0,1 % (v/v).

A Figura 28 indica que a quantificação direta de ACYS individuais a partir de medidas de absorvância em UV-VIS não é trivial, pois seus espectros são muito semelhantes, com intensa sobreposição. Eventualmente métodos quimiométricos de calibração multivariada ou deconvolução de curvas sejam necessários para resolver o problema e isso representa uma perspectiva futura de trabalhos do GPQUAE.

Por outro lado, esses espectros trazem indicações sobre as estruturas das antocianinas, em função da quantidade de grupos metoxilas e hidroxilas presentes nos padrões de ACYS utilizados. A Tabela 3 traz um resumo dessas informações e as estruturas desses padrões estão apresentadas no *ANEXO 4*.

Tabela 13: Número de grupos metoxila e hidroxila nas estruturas dos padrões de ACYS utilizados.

Padrão	Nome	Número de Metoxilas	Número de Hidroxilas	λ máx (nm)
p1	cloreto de pelargonidina	0	8	521
p2	cloreto de malvidina-3-glicosídeo	1	10	528
p3	cloreto de pelargonidina-3-glicosídeo	0	8	508
p4	cloreto de cianidina-3-galactosídeo	0	11	523
p5	cloreto de cianidina-3-glicosídeo	2	7	530
p6	cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo	0	7	524
p7	cloreto de cianidina-3-rutinosídeo	1	7	531
p8	cloreto de peonidina-3-glicosídeo	0	4	525

Com relação à influência de grupos metoxilas e hidroxilas no comprimento de onda de absorção máxima, pode-se observar que p2, p5 e p7, são os padrões que apresentam os maiores comprimentos de onda de absorção máxima. Isto está diretamente relacionado com a maior quantidade de grupos metoxilas, que leva a um deslocamento batocrômico quando comparado com outras ACYS^{94,101}. Os demais padrões apresentam um deslocamento hipsocrômico do comprimento de onda de absorção máxima, pois apresentam maior número de grupos hidroxilas quando comparados aos p2, p5 e p7^{94,101}. Isto aponta a relevância da espectrofotometria para obtenção de informações estruturais de ACYS.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

Avaliando os resultados obtidos para os procedimentos de extração, conclui-se que ACYS podem ser extraídas de maneira simples e rápida com a utilização de etanol 94% v/v como solvente extrator, sendo a mais vantajosa em comparação com os demais solventes testados porque permite obter extratos mais concentrados e mais estáveis, além de evitar o aparecimento de fungos durante um período mais longo.

Os testes com o resíduo líquido que se considerou “produto de extração indireta pela água do degelo” mostraram que cerca de 12% de ACYS estavam contidas nesse resíduo, portanto o mesmo não deve ser considerado desprezível, principalmente quando a proposta visa aplicação industrial.

Os resultados dos testes de estabilidade indicaram que se observa menor degradação de ACYS quando se utiliza apenas casca no processo de extração da jabuticaba e do refugo, com etanol 94% v/v como solvente extrator. Este solvente apresentou melhores resultados também para as duas espécies de amoras estudadas. Além disso, a utilização de armazenamento sob refrigeração dos extratos obtidos é mais adequada.

Os extratos de refugo degradaram mais rapidamente quando comparados aos extratos de jabuticaba, provavelmente porque nesses frutos que já sofreram algum tipo de deterioração, os produtos de ação de microorganismos, oxigênio e enzimas estão presentes em maior quantidade e isto pode acelerar os processos de degradação.

O uso de conservantes em extratos aquosos reduz o aparecimento de fungos e também retarda a degradação total das ACYS quando comparados a extratos aquosos que não utilizaram conservantes. Apenas no caso do sorbato de potássio devido suas características houve degradação total das ACYS nos primeiros 30 dias de armazenamento. O conjunto nipagin +nipazol foi o que apresentou melhores resultados de conservação dos extratos estudados, além de ser o mais barato. Os extratos mantiveram-se sem aparecimento de fungos durante 300 dias de monitoramento.

Em relação à obtenção dos “extratos secos de ACYS”, a secagem sob fluxo de ar em capela mostrou-se mais vantajosa por ser mais rápida e simples, com reduzida exposição do material de interesse a fatores como luz, variação de temperatura entre outros que interferem na degradação das ACYS.

De acordo com os resultados obtidos pelos métodos espectrofotométricos e suas adaptações (Tabela 6, página 60), há concordância dos resultados, apontando a adequação de uso direto das medidas de absorbância dos extratos em solução com $\text{pH} = 1,0$ para quantificação de ACYS totais presentes, sem necessidade de uso de padrão que tem custo elevado, nem outras correções adicionais, o que agiliza procedimentos de quantificação para rotina industrial. Os teores médios de ACYS nas frutas estudadas pelo método espectrofotométrico **F1S** foram em mg ACYS/100 g de fruta: 153 ± 3 para amora, 83 ± 2 para amora preta, $40,0 \pm 0,2$ para jabuticaba e $31,8 \pm 0,6$ para refugo. Os teores médios de ACYS nas frutas estudadas pelo método utilizando HPLC foram em mg ACYS/100 g de fruta: 180 ± 4 para amora, 68 ± 5 para amora preta, 25 ± 2 para jabuticaba e 27 ± 2 para refugo. Esses resultados obtidos a partir de técnicas diferentes não apresentaram diferença significativa com 95 % de confiança.

Ao realizar a comparação do método utilizando HPLC com o método espectrofotométrico **F1S** para quantificação de ACYS totais em extratos de frutas, **F1S** com medidas de absorbância em $\text{pH} = 1,0$ no comprimento de onda de absorção máxima mostrou-se ainda mais adequado para aplicação industrial, pois apresenta características de simplicidade, rapidez nas medidas, baixo custo de análises e não necessita a utilização de padrões de ACYS que possuem custo elevado.

Os espectros apresentados na Figura 28 são muito semelhantes, com intensa sobreposição, o que dificulta a quantificação de ACYS individuais por métodos espectrofotométricos. Eventualmente métodos quimiométricos de calibração multivariada ou para deconvolução de curvas sejam necessários para resolver o problema e isso representa uma perspectiva futura de trabalhos do GPQUAE.

CAPÍTULO 6:

TRATAMENTO DE RESÍDUOS

Todos os resíduos gerados durante os trabalhos experimentais foram descartados e/ou tratados corretamente de acordo com as normas da Comissão de segurança do IQ-UNICAMP.

As soluções ácidas ou básicas sem íons tóxicos foram descartadas na pia após neutralização.

O metanol foi armazenado em frascos adequados e submetido à Comissão de segurança para enviá-lo para incineração.

A acetonitrila foi armazenada em recipientes adequados e tratada pela Comissão de segurança seguindo-se as recomendações descritas nas referências:

- ✓ Prudent Practices for Disposal of Chemicals from Laboratories, Committee of Hazardous Substances in the Laboratory, Washington D.C., National Academy Press, **1983**.
- ✓ Toxic and Hazardous Industrial Chemicals Safety Manual, Japan, International Technical Information Institute, **1982**.

CAPÍTULO 7: PERSPECTIVAS

Tendo em vista a perspectiva de início de aplicação industrial dos processos otimizados de extração, planeja-se a realização de testes em escala piloto e o estudo de secagem de frutas para testes como nova forma de material de partida.

Como a quantificação de ACYS totais em extratos de frutas é de interesse para implementação de processo industrial, prevê-se a elaboração de um protocolo de análise para aplicação em análises de rotina para controle da qualidade dos extratos com procedimento simples e validado, envolvendo medidas espectrofotométricas.

As dificuldades de quantificação de ACYS individuais por espectrofotometria devidas à semelhança de espectros podem vir a ser superadas com a aplicação de procedimentos de calibração multivariada e algoritmos de resolução de curvas, o que já está em planejamento para outros trabalhos do GPQUAE. Além disso, também se pretende explorar a potencialidade de métodos quimiométricos para estimar outros parâmetros de qualificação de extratos e fontes de ACYS, cujo potencial de aplicação nos mais diversos segmentos certamente estimula novos estudos.

CAPÍTULO 8: REFERÊNCIAS

1. HARBORNE, J. B.; *The Flavonoids: advanced in research since 1986*, Chapman and Hall: New York, 5th edition, **1994**.
2. KIRCA, A.; OZKAN, M.; CEMEROGLU, B.; "Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars"; *Food Chemistry*; **2006**, 97(4), p. 598.
3. ALKEMA, S.; SEAGER, S.L.; "The chemical pigments of plants"; *Journal of Chemical Education*; **1982**, 59(3), p. 183.
4. JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A.; "A Review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis", *Journal of Food Biochemistry*, **1987**, 11(4), p. 279.
5. JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A.; Speers, R. A.; "Anthocyanins as food colorants", *Journal of Food Biochemistry*, **1987**, 11(3), p. 201.
6. COOK, N. C.; SAMMAN, S.; "Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources", *Journal of Nutritional Biochemistry*, **1996**, 7(2), p. 66.
7. EIBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X. D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J.; "Anthocyanin antioxidants from edible fruits"; *Food Chemistry*; **2004**, 84(1), p. 23.
8. HARBORNE, J. B.; *Comparative biochemistry of the flavonoids*, Academic Press: London, **1967**.
9. HARBORNE, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H.; *The flavonoids*, Academic Press: New York, **1975**.
10. TÜRKER, N.; ERDOGDU, F.; "Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.)"; *Journal of Food Engineering*; **2006**, 76(4), p. 579.
11. 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*; **2002**, 50(21), p. 6172.
12. FRANCIS, F.J.; "Food Colorants: Anthocyanins"; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1989**, 28(4), p. 273.

13. GRIS, E. F.; FERREIRA, E. A.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; "Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from *Cabernet Sauvignon* grape extracts in model systems"; *Food Chemistry*, **2007**, 100(3), p. 1289.
14. LILA, M. A.; "Anthocyanins and human health: An *in vitro* investigative approach"; *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2004**, 2004(5), p. 306.
15. JANEIRO, P.; BRETT, A. M. O.; "Redox behavior of anthocyanins present in *Vitis vinifera* L."; *Electroanalysis*, **2007**, 19(17), p. 1779.
16. HRAZDINA, G.; BORZELL, A. J.; ROBINSON, W. B.; "Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides"; *American Journal of Enology and Viticulture*, **1970**, 21(4), p. 201.
17. MALIEN, A.; DANGLES, O.; AMIOT, M. J.; "Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49(1), p. 170.
18. GRIS, E. F.; FERREIRA, E. A.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; "Influence of ferulic acid on stability of anthocyanins from *Cabernet Sauvignon* grapes in a model system and a yogurt system"; *International Journal of Food Science and Technology*, **2007**, 42(8), p. 992.
19. REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G.; "Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46(11), p. 4592.
20. TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V.; "Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?"; *Química Nova*, **2002**, 25(4), p. 684.
21. MEBANE, R. C.; RYBOLT, T. R.; "Edible acid-base indicators"; *Journal of Chemical Education*, **1985**, 62(4), p. 285.
22. COUTO, A. B.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G.; "Aplicação de pigmentos de flores no ensino de química"; *Química Nova*, **1998**, 21(2), p. 221.

23. SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E. T. G.; “Aplicação de extratos brutos de flores de quaresmeira e azaléia e da casca de feijão preto em volumetria ácido-base. Um experimento para cursos de análise quantitativa”; *Química Nova*, **2001**, 24(3), p. 408.
24. CORTES, M.S.; RAMOS, L.A.; CAVALHEIRO, E.T.G.; “Titulações espectrofotométricas de sistemas ácido-base utilizando extrato de flores contendo antocianinas”; *Química Nova*, **2007**, 30(4), p. 1014.
25. GEPEC; “Estudando o equilíbrio ácido-base: Extrato de repolho roxo como indicador universal de pH”; *Química Nova na Escola*, **1995**, 1, p. 32.
26. <<http://www.ufrgs.br/Alimentus/méd/2004-01/seminários/corantes.doc>>. Acesso em: 13 de nov. 2007
27. MACZ-POP, G. A.; RIVAS-GONZALO, J. C.; PÉREZ-ALONSO, J. J.; GONZALÉZ-PARAMÁS, A. M.; “Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.)”; *Food Chemistry*; **2006**, 94(3), p. 448.
28. GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E.; “Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems”; *Biochemical Engineering Journal*; **2003**, 14(3), p. 217.
29. WROLSTAD, R. E.; “Anthocyanin pigments – Bioactivity and coloring properties”; *Journal of Food Science*, **2004**, 69(5), p. 419.
30. SCHARRER, A.; OBER, M.; “Anthocyanosides in the treatment of retinopathies”; *Klin Monatsbl Augenheilkd*; **1981**, 178(5), p. 386.
31. MURRAY, M. T.; “Bilberry (*Vaccinium myrtillus*)”; *American Journal of Natural Medicine*; **1997**, 4(1), p. 17.
32. KADAR, A.; ROBERT, L.; MISKULIN, M.; TIXIER, J. M.; “Influence of anthocyanoside treatment on the cholesterol-induced atherosclerosis in the rabbit”; *Paroi Arterielle – Aterial Wall.*; **1979**, 5(4), p. 187.
33. TIMBERLAKE, C. F.; HENRY, B. S.; “Anthocyanins as natural food colorants”; *Progress in Clinical Biological Research*; **1988**, 280, p. 107.

34. RAMIREZ, M. R.; IZQUIERDO, I.; RASEIRA, M. C. B.; ZUANAZZI, J. A.; BARROS, D.; HENRIQUES, A. T.; "Effect of lyophilised *Vaccinium* berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats"; *Pharmacological Research*, **2005**, 52(6), p. 457.
35. REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I. B.; KENELLY, E. J.; "Bioactive depsides and anthocyanins from *Jaboticaba* (*Myrciaria cauliflora*)"; *Journal of Natural Products*, **2006**, 69(8), p. 1228.
36. KANG, S. Y.; SEERAM, N. P.; NAIR, M. G.; BOURQUIN, L. D.; "Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in ApcMin mice and reduce proliferation of human colon cancer cells", *Cancer Letters*, **2003**, 194(1), p. 13.
37. HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; "Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability"; *Food and Chemical Toxicology*, **1999**, 37(9-10), p. 937.
38. CHEN, P. N.; CHU, S. C.; CHIOU, H. L.; KUO, W. H.; CHIANG, C. L.; HSIEH, Y. S.; "Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line"; *Cancer Letters*; **2006**, 235(2), p. 248.
39. SHIN, W. H.; PARK, S. J.; KIM, E. J.; "Protective effect of anthocyanins in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of cerebral ischemia in rats"; *Life Sciences*; **2006**, 79(2), p. 130.
40. PALOMBINO, D. D.; "Extração, purificação e isolamento de antocianinas de jambolão (*Syzygium cumini*) e avaliação dos seus efeitos biológicos"; Dissertação de Mestrado; Instituto de Química – UNICAMP, Campinas, São Paulo, **2006**.
41. KATSUBE, N.; IWASHITA, K.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M.; "Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51(1), p. 68.
42. CAO, G.; BOOTH, S. L.; SADOWSKI, J. A.; PRIOR, R. L.; "Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables"; *American Journal of Clinical Nutrition*, **1998**, 68(5), p. 1081.
43. KLIGMAN, A. M.; "Cosmecêuticos: a terceira categoria"; *Cosmetics & Toiletries*, **2002**, 14, p. 72.

44. <<http://www.crfjrj.org.br/crf/revista/67/>>. Acesso em 03 de dez. 2007.
45. MISHRA, D. K.; DOLAN, K. D.; YANG, L.; “Confidence intervals for modeling anthocyanin retention in grape pomace during nonisothermal heating”; *Journal of Food Science*, **2008**, 0(0). Disponível em <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em 12 de dez. 2007.
46. MATSUMOTO, H.; HANAMURA, S.; HIRAYAMA, M.; “Process for producing purified anthocyanin and crystalline anthocyanin”; patente nº 7.211.413. Disponível em <<http://www.uspto.gov/patft/index.html>>. Acesso em 03 de dez. 2007.
47. <<http://www.sigma-aldrich.com.br/>>. Customer Service with Mirelle de Lima.
48. LEE, H. S.; HONG, V.; “Chromatographic analysis of anthocyanins”; *Journal of Chromatography A*; **1992**, 624(1-2), p. 221.
49. TERCI, D. B. L.; “Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas”; Tese de Doutorado; Instituto de Química – UNICAMP, Campinas, São Paulo, **2004**.
50. ALASALVAR, C.; AL-FARSI, M.; SHAHIDI, F.; “Compositional characteristics and antioxidant component of cherry *Laurel Varieties* and *Pekmez*”; *Journal of Food Science*, **2005**, 70(1), p. S47.
51. JING, P.; GIUSTI, M. M.; “Effects of extraction conditions on improving the yield and quality of an anthocyanin-rich purple corn (*Zea mays* L.) color extract”, *Journal of Food Science*, **2007**, 0(0), p. C1.
52. GARCIA-VIGUERA, C.; ZAFRILLA, P.; TOMÁS-BARBERÁN, A.; “The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit”; *Phytochemical Analysis*, **1998**, 9(6), p. 274.
53. McGHIE, T. K.; ROWAN, D. R.; EDWARDS, P. J.; “Structural identification of two major anthocyanin components of *Boysenberry* by NMR Spectroscopy”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54(23), p. 8756.
54. AMR, A.; AL-TAMIMI, E.; “Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colorants”; *International Journal of Food Science and Technology*, **2007**, 42(8), p. 985.

55. JANNA, O. A.; KHAIRUL, A. K.; MAZIAH, M.; "Anthocyanin stability studies in *Tibouchina semidecandra* L.; *Food Chemistry*, **2007**, 101(4), p. 1640.
56. BAILONI, M. A.; BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O.; "Stability of the anthocyanins from *Acalypha hispida* and copigmentation effect", *Acta Alimentaria*, **1999**, 28(2), p. 161.
57. SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R.E.; FINN, C. E.; PEREIRA, C.B.; "Influence of cultivar, maturity and sampling on blackberry (*Rubus* L. Hybrids) Anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2004**, 52(26), p. 8021.
58. SYVACY, A.; SÖKMEN, M.; "Seasonal changes in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin constituent of the stems of two *Morus species* (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.)", *Plant Growth Regulation*, **2004**, 44(3), p. 251
59. PETRI, G.; KRAWCZYK, U.; KÉRY, À.; "Spectrophotometric and chromatographic investigation of bilberry anthocyanins for quantification purposes"; *Microchemical Journal*; **1997**, 55(1), p. 12.
60. SONDEHEIMER, E.; KERTESZ, Z.; "Colorimetric determination in strawberries and strawberry products"; *Analytical Chemistry*; **1948**, 20(3), p. 245.
61. FULEKI, T.; FRANCIS, F. J.; "Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries"; *Journal of Food Science*; **1968**, 33(1), p. 72.
62. FULEKI, T.; FRANCIS, F. J.; "Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice"; *Journal of Food Science*; **1968**, 33(1), p. 78.
63. TIAN, Q.; AZIZ, R. M.; STONER, G. D.; SCHWARTZ, S. J.; "Anthocyanin determination in black raspberry (*Rubus occidentalis*) and biological specimens using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry", *Journal of Food Science*, **2005**, 70(1), p. C43
64. GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. E.; "Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy"; *In Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; Protocol F1.2; London: John Wiley and Sons, Inc. **2000**.

65. 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*, **2005**, 88(5), p. 1269.
66. PRODANOV, M. P.; DOMINGUEZ, J. A.; BLAZQUEZ, I.; SALINAS, M. R.; ALONSO, G. L.; "Some aspects of the quantitative/qualitative assessment of commercial anthocyanin-rich extracts"; *Food Chemistry*, **2005**, 90(4), p. 585.
67. BAKKER, J.; PRESTON, N. W.; TIMBERLAKE, C. F.; "The determination of anthocyanins in aging red wines: Comparison of HPLC and spectral methods"; *American Journal of Enology and Viticulture*, **1986**, 37(2), p. 121.
68. ZHANG, Z.; KOU, X.; FUGAL, K.; McLAUGHLIN, J.; "Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in Bilberry extracts"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52(4), p. 688.
69. KAHKONEN, M. P.; HEINAMAKI, J.; OLLILAINEN, V.; HEINONEN, M.; "Berry anthocyanins isolation, identification and antioxidant activities"; *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2003**, 83(14), p. 1403.
70. CHANDRA, A.; RANA, J.; LI, Y.; "Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49(8), p. 3515.
71. HASSIMOTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.; "Identification and Characterisation of Anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil"; *Food Science Technology International*, **2007**, 13(1), p. 17.
72. <http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Morus_nigra.htm>. Acesso em 11 de fev. 2008.
73. <<http://picasaweb.google.com/Amezzomo2002/FruitsFrutasFrutalesFruchteFrutti6/photo#5079943558379331090>>. Acesso em 11 de fev. 2008.
74. ANTUNES, L. E. C.; "Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil"; *Ciência Rural*, **2006**, 32(1), p. 151.

75. <http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/rubus_cf_fruticosus.htm>. Acesso em 11 de fev. 2008.
76. <http://www.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CA_01548.doc>. Acesso em 11 de fev. 2008.
77. <http://www.portaldoagronegocio.com.br/imagens_texto/t_amora_preta:_fruticolas_1804069754.jpg>. Acesso em 11 de fev. 2008.
78. <<http://www.tribunadoplanalto.com.br/agronegocio/especial.htm>>. Acesso em 26 de set. 2005.
79. <<http://www.jaboticabal.sp.gov.br/jaboticabal/?tm=historia>>. Acesso em 14 de dez. 2007.
80. <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/imagens/Plate51.jpg>>. Acesso em 11 de fev. 2008.
81. <<http://www.herbario.com.br/dataherb16/jaboticaba.htm>>. Acesso em 11 de fev. 2008.
82. CHRISTIAN, G. D.; *Analytical Chemistry*; 2nd Edition; John Wiley & Sons: New York, **1977**.
83. JEFFREY, G. H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; *VOGEL – Análise Química Quantitativa*; 5^a edição; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, **1992**.
84. BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S.; *Química Analítica quantitativa elementar*, 3^a edição, Edgard Blücher: São Paulo, **2001**.
85. CALVO, E. S.; *Guia de Aditivos*, Acríbia: Zaragoza, **1994**.
86. *Codex Alimentarius Commission*, Joint FAO/WHO Food Standards Programme: Roma, **1992**.
87. <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/index.htm>>. Acesso em 21 de nov. 2007.
88. DUGO, P.; MONDELLO, L.; ERRANTE, G.; ZAPPIA, G.; DUGO, G.; "Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high performance liquid chromatography with electrospray ionization detection"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49(8), p. 3987.

89. SAMPAIO, P. G.; ROSSI, A. V.; Livro de Resumos 14º Encontro Nacional de Química Analítica, CR 083, **2007**.
90. GOIFFON, J. P.; MOULY, P. P.; GAYDOU, E. M.; "Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and scrups usind liquid chromatography"; *Analytica Chimica Acta*, **1999**, 382(1-2), p. 39.
91. FANG, Z.; ZHANG, M.; SUN, Y.; SUN, J.; "How to improve bayberry (*Myrica rubra* Sieb. Et Zucc.) juice color quality: effect of juice processing on bayberry anthocyanins and polyphenolics"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2006**, 54(1), p. 99.
92. MENG, L.; LOZANO, Y.; BOMBARDA, I.; GAYDOU, E.; LI, B.; "Anthocyanin and flavonoid production from *Perilla frutescens*: pilot plant scale processing including cross-flow microfiltration and reverse osmosis"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2006**, 54(12), p. 4297.
93. MILLER, J. N.; MILLER, J. C.; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*; 4th Edition; Prentice Hall: London, **2000**.
94. FALCÃO, L. D.; BARROS, D. M.; GAUCHE, C.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; "Copigmentação intra e intermolecular de antocianinas: uma revisão"; *B. CEPPA*, **2003**, Curitiba, 21(2), p. 351.
95. ASCHERI, D. P. R.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P.; "Caracterização da farinha de bagaço de jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados"; *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **2006**, 26(4), p. 1.
96. MOTA, W. F.; SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, M. C. T.; CECON, P. R.; "Influência do tratamento pós-colheita com cálcio na conservação de jabuticabas"; *Revista Brasileira Fruticultura*, **2002**, 24(1), p. 49.
97. <<http://www.centroflora.com.br>>. Acesso contínuo
98. GIUSTI, M. M.; SAONA, L. E. R.; WROLSTAD, R. E.; "Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1999**, 47(11), p. 4631.
99. TORKANGERPOLL, K.; ANDERSEN, O. M.; "Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values"; *Food Chemistry*; **2005**, 89(3), p. 427.

100. SAMPAIO, P. G.; “Estudos de esterilização e identificação de extratos de antocianinas”, Projeto de Mestrado, em andamento, Instituto de Química – UNICAMP, Campinas, São Paulo, **2007**.
101. STINTZING, F. C.; CARLE, R.; “Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition”; *Trends in Food Science and Technology*, **2004**, 15(1), p. 19.

ANEXOS:

ANEXO 1: Informações de características físico-químicas e microbiológicas da água corrente utilizada nos experimentos.



1/1

RELATÓRIO DE ANÁLISES N.º 1304-4/07

DADOS DO CLIENTE			
Cliente: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP			
Endereço: Rua Zeferino Vaz – ESTEC			
Cidade: Campinas - SP		Contato: Eng.º Vicente	
DADOS DA AMOSTRA			
Descrição da amostra: Água Tratada		Identificação da Eco System: F 18494 e B 27232	
Ponto de coleta: Reservatório Principal - IQ		Coletor: Eco System	
Data da coleta: 22/03/07		Horário da coleta: 14:18 hrs	
Data da entrada no laboratório: 22/03/07		Data da emissão do relatório: 02/04/07	

RESULTADOS ANALÍTICOS

PADRÃO DE ACEITAÇÃO PARA CONSUMO HUMANO

Parâmetro	Unidade	Valor Máximo Permitido	Amostra F 18494
Alumínio	mg/L Al	0,2	0,03
Amônia (como NH ₃)	mg/l NH ₃	1,5	< 0,01
Cloro	mg/l Cl ⁻	250	34,5
Cor Aparente	UH	15	5
Dureza	mg/l CaCO ₃	500	70
Etilbenzeno	mg/l	0,2	< 0,01
Ferro	mg/l Fe	0,3	< 0,01
Manganês	mg/l Mn	0,1	0,06
Monoclorobenzeno	mg/l	0,12	< 0,001
Odor	-	Não Objetável	Não Objetável
Gosto	-	Não Objetável	Não Objetável
Sódio	mg/l Na	200	6
Sólidos Dissolv. Totais	mg/l	1000	41
Sulfato	mg/l SO ₄	250	7
Sulfeto de Hidrogênio	mg/l H ₂ S	0,05	< 0,001
Surfactantes	mg/l LAS	0,5	< 0,001
Tolueno	mg/l	0,17	< 0,001
Turbidez	UT	5	< 1
Zinco	mg/l Zn	5	0,02
Xileno	mg/l	0,3	< 0,001
pH a 25° C	-	6,0 – 9,5	8,07

MICROBIOLOGIA

Parâmetros	Unidade	Valor Máximo Permitido	Amostra B 27232
Coliformes Totais	NMP/100ml	Ausente	Ausente
Escherichia Coli	NMP/100ml	Ausente	Ausente

Item 1) Este relatório só poderá ser reproduzido na sua íntegra e sem nenhuma modificação
 Item 2) As avaliações analíticas referem-se somente às amostras coletadas pelo Laboratório

Metodologia Analítica: "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" – 21th Edition, 2005

Norma Consultada: Portaria 518 de 25/03/2004 do Ministério da Saúde.

CONCLUSÃO

A amostra está de acordo com os padrões Físico-Químicos e Bacteriológicos conforme a Portaria 518 de 25 de Março de 2004 do Ministério da Saúde, quanto aos parâmetros analisados.

Gabriela Scarpini
 Gerente Técnico
 CRQ: 044532/0-4º

Fernanda Mara de Sousa
 Analista Química
 CRQ: 04200569-4º

Márcia Aparecida Contieri
 Bióloga
 CRBio: 23820/01-D

**BOLETIM DE ANÁLISE Nº 16573/2007-0**

Processo Comercial Nº 1173/2007-4

DADOS REFERENTES AO CLIENTE

Empresa solicitante:	Universidade Estadual de Campinas
Endereço:	Rua Candido Portinari Cid. Universitária Zeferino Vaz, 165 - - Barão Geraldo - Campinas - SP - CEP: 13.083-817 .
Nome do Solicitante:	Vicente Vale

DADOS REFERENTES A AMOSTRA

Identificação do Cliente:	Água Reservatório Instituto Química		
Amostra Rotulada como:	Água		
Coletor:	Anderson Coelho (Bioagri)	Data da coleta:	20/3/2007 09:47:00
Data da entrada no laboratório:	20/03/2007	Data de Elaboração do BA:	26/03/2007

RESULTADOS ANALÍTICOS DA AMOSTRA

Parâmetros	Unidade	LQ	Resultados analíticos	Portaria 518/04 - VMP
Cor	Hazem	5	5	15
Turbidez	UNT	0,1	2,0	5
pH	pH	0 - 14	7,70	6,0 - 9,5 (*)
Coliformes Totais	PA/100mL	---	Ausentes	Ausentes

Portaria 518/04 - VMP portaria 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde

pH* = Faixa Recomendada

Notas

LQ = Limite de Quantificação.

Abrangência

O(s) resultado(s) referem-se somente à(s) amostra(s) analisada(s).

Este Boletim de Análise só pode ser reproduzido por inteiro e sem nenhuma alteração.

Data de realização das análises

A Bioagri Ambiental garante que todas as análises foram executadas dentro do prazo de validade de cada parâmetro segundo o Guia de Coleta e Preservação de Amostra SQB 008 da Bioagri Ambiental, e condições descritas na proposta comercial referente a este trabalho. Todas estas datas constam nos dados brutos das análises e estão à disposição para serem solicitadas a qualquer momento pelo interessado.

Plano de Amostragem

Local da Coleta: Reservatório Instituto Química

Tipo de Amostragem: Simples (pontual)

Ocorrência de chuva nas últimas 24h: Sim

Outras informações: Amostra Limpa

Interpretação dos Resultados

Comparando-se os resultados obtidos para a amostra com os valores estabelecidos pela portaria 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde podemos observar que: Os parâmetros satisfazem os limites permitidos.

Referências Metodológicas

Coliformes: SMEWW 9223 B - Enzyme Substrate coliform Test

Cor: SMEWW 2120 C - Spectrophotometric Method

pH: SMEWW 4500 - H+ - B - Electrometric Method

Turbidez: SMEWW 2130 B - Nephelometric Method

Revisores



Valéria Diniz Castilho
Sabrina Teruko Takami
Carlos Goia

Valéria Diniz Castilho
Valéria Diniz Castilho
Coordenadora de Projeto
CRQ 04456607 - 4ª Região

ANEXO 2: Avaliação de Vazão da Capela pela Comissão de Segurança do Instituto de Química da UNICAMP.



Diretoria de Segurança do Trabalho –
Instituto de Química

Página 1 de 1

Campinas 17 de dezembro de 2007.

ST- 47 / 2007

Para:

Martha Maria Andreotti Fávaro

De:

Diretoria de Segurança do Trabalho - IQ

Ref: Avaliação de vazão de ar na capela.

Prezada Martha,

Conforme vossa solicitação, informamos que no dia 17/12/2007, avaliamos a vazão de ar da capela do laboratório I -125 às 14h40. Utilizando-se um anemômetro digital de marca LT Lutron, modelo AM-4202, devidamente calibrado em 27/11/2007, na faixa de medição metros por segundo (m/s), foi analisada a velocidade do ar em vários pontos da capela, obtendo os seguintes resultados:

Capela / Patrimônio Nº	Vazão:	Abertura:
11/10700	0,6 m/s	28 cm

Considerando a Instrução Normativa SESMT/DGRH / UNICAMP Nº. 03/2005 "A vazão do ventilador deve ser especificada para fornecer velocidade de ar na abertura frontal na ordem de 100 a 150fpm (0,5 a 0,762 m/s)".

Obs. A instrução Normativa (IN) SESMT/DGRH / UNICAMP Nº. 03/2005 é a revisão mais atual da IN - SESMT/DGRH / UNICAMP Nº04/1988.

Conclusão:

De acordo com o resultado obtido a capela atende as especificações mínimas de vazão de ar, de acordo com a Instrução Normativa SESMT/DGRH / UNICAMP Nº. 03/2005. Devendo o (a) usuário (a) manter a tampa em abertura máxima de acordo com a demarcação amarela feita nas laterais da capela.

Elizabeth Fernandes Ferreira

Diretora da Seg. do Trabalho do IQ.

Willian Felipe

Técnico em Segurança no Trabalho

ANEXO 3: Testes estatísticos utilizados para análise dos dados

Teste t -pareado:

O teste t -pareado tem a finalidade de comparar a exatidão entre resultados de dois métodos diferentes, utilizando-se a *Equação 18*⁸⁵.

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{s \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)^{1/2}} \quad \text{Equação 18}$$

onde: $\bar{X}_1$ e $\bar{X}_2$ = médias das determinações de cada método, s = estimativa do desvio padrão, n_1 e n_2 = número de determinações de cada método.

O intervalo de confiança utilizado foi de 95 % e o grau de liberdade foi o número de determinações de cada método. Com esses dois parâmetros encontra-se o valor de t_{tabelado} .

Se o valor de $t_{\text{calculado}}$ for menor que o valor de t_{tabelado} , os resultados não possuem diferença estatística significativa com 95 % de confiança⁸⁵.

Teste F:

O Teste F tem a finalidade de comparar a precisão dos resultados, utilizando-se a *Equação 19*⁸⁵.

$$F = \frac{s_x}{s_y} \quad \text{Equação 19}$$

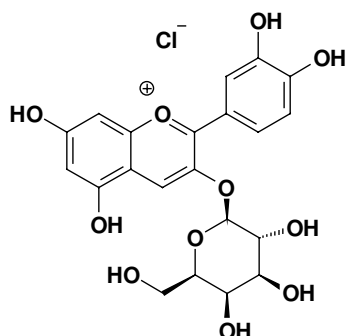
onde: s_x e s_y são os valores de variância obtidos pelos dois métodos, sendo que, por convenção, o valor de variância maior é colocado no numerador.

O intervalo de confiança utilizado foi de 95 % e com esse parâmetro encontra-se o valor de $F_{\text{crítico}}$.

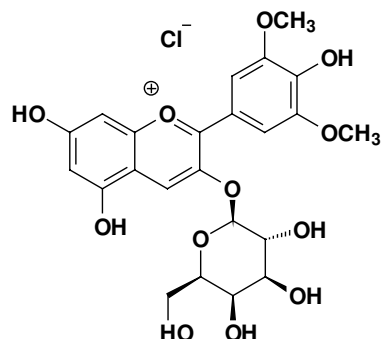
Se o valor de $F_{\text{calculado}}$ for menor que o valor de $F_{\text{crítico}}$ os resultados não possuem diferença estatística significativa com 95 % de confiança⁸⁵.

ANEXO 4: Estruturas dos padrões de ACYS utilizados no estudo com espectrofotometria.

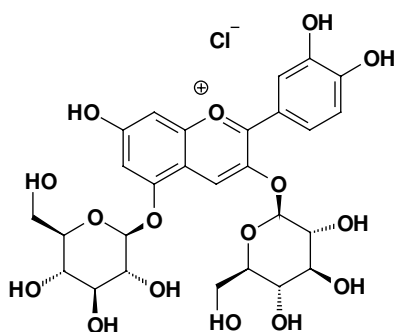
Cloreto de Cianidina-3-Galactosídeo



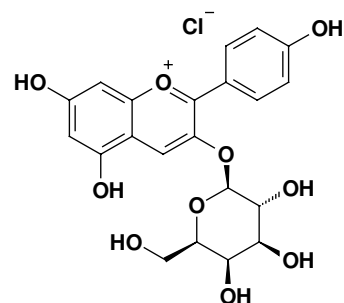
Cloreto de Malvidina-3-glicosídeo



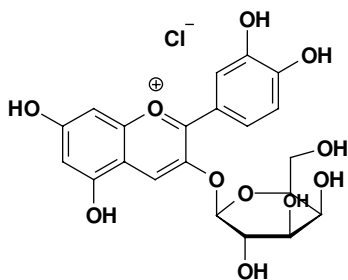
Cloreto de Cianidina-3,5-diglicosídeo



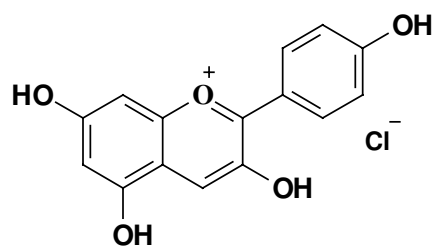
Cloreto de Pelargonidina-3-glicosídeo



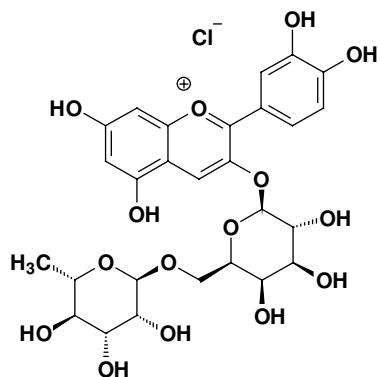
Cloreto de Cianidina-3-glicosídeo



Cloreto de Pelargonidina



Cloreto de Cianidina-3-rutinosídeo



Cloreto de Peonidina-3-glucosídeo

