



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

**ELAINE BERGER CERESINO**

**ARAÇÁÚNA: FONTE NÃO EXPLORADA DE PIGMENTOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
APRESENTADA À FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PROF Dra. ADRIANA ZERLOTTI MERCADANTE**

**Orientadora**

Campinas  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

C334a Ceresino, Elaine Berger, 1985-  
Araçáúna: fonte não explorada de pigmentos / Elaine  
Berger Ceresino. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

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

1. Pigmentos. 2. Antocianinas. 3. Carotenóides.  
4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). I.  
Mercadante, Adriana Zerlotti. II. Universidade Estadual  
de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.  
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Araçáúna: a non-analyzed source of pigments

Palavras-chave em inglês:

Pigments

Anthocyanins

Carotenoids

High performance liquid chromatography (HPLC)

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Adriana Zerlotti Mercadante [Orientador]

Neura Bragagnolo

Célia Maria de Sylos

Data da defesa: 23/03/2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Elaine Berger Ceresino, aprovado pela comissão julgadora em 23 de março de 2012.

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Adriana Zerlotti Mercadante (Orientadora)  
Universidade Estadual de Campinas

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Neura Bragagnolo  
Universidade Estadual de Campinas

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Célia Maria de Sylos  
Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” - FCFAR

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Veridiana Vera de Rosso  
Universidade Federal de São Paulo

---

Prof Dr. Marcelo Alexandre Prado  
Universidade Estadual de Campinas

***Queremos ter certezas e não dúvidas, resultados e não experiências, mas nem mesmo percebemos que as certezas só podem surgir através das dúvidas e os resultados somente através das experiências***

***Carl Gustav Jung***

## **Dedico**

**Aos meus pais Aloisio e Elfrida, pelo amor, sabedoria, valores e ensinamentos que contribuíram para meu amadurecimento. Ao Hans pela sua alegria. A minha irmã Aline, por estar com eles durante todos os anos em que estive ausente e pelo seu carinho.**

**Ao Fabiano, pela força e pela presença em todos os momentos.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Prof. Dra. Adriana Mercadante pela orientação durante a execução da dissertação de mestrado.

Também gostaria de agradecer à banca examinadora pelas observações valiosas, sugestões, atenção e tempo dedicados ao aperfeiçoamento do trabalho.

Ao CNPq e a FAPESP.

Aos meus colegas do laboratório de Química de Alimentos pela companhia, pela imensurável contribuição científica e prática na realização deste trabalho, à Rosemar pela ajuda e a Incaper por me guiar inicialmente em relação ao estudo da fruta.

Agradeço profundamente aos meus pais, que me incentivaram desde muito jovem a estudar, e para isso não mediram esforços pessoais.

Agradeço também a todos os meus amigos da turma V3/M3 que conviveram comigo durante os anos que passamos juntos no CEFET-ES. Todos, sem exceção, são grandes exemplos de luta, coragem e vitória, independentemente de quaisquer condições adversas. Da mesma forma, agradeço especialmente ao prof. José Júlio Garcia de Freitas, que desde então, torceu por mim e esteve sempre presente.

Não poderia deixar de lembrar das minhas queridas amigas Marília, Bethânia, Kika, Débora, Fabiana, Thais e demais “Mocréias”, e ao Murilo pelas conversas na escada da biblioteca, muito proveitosas, fortalecendo nossa amizade. À Prof. Dra. Valéria Paula Rodrigues Minim, que me deu a oportunidade de iniciar uma carreira científica, me apoiando e me orientando de maneira didática, e por ter depositado em mim sua confiança.

Ao Paulo de Luna Freire, e à Dra. Cláudia R. F. Campos pela assistência nos momentos difíceis.

Em especial, agradeço ao Fabiano Contesini pela companhia, amor, compreensão e também por sempre me lembrar do caminho percorrido por mim até os dias atuais.

Ao mais importante que é Deus, por me haver amado antes que o mundo existisse, desde sempre desejando dar-me a vida, por me fortalecer e me renovar a cada dia.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO .....	xii
SUMMARY.....	xiii
1. Introdução Geral.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	4
2.1. Composição de carotenóides e antocianinas em frutas da família Myrtaceae.....	4
2.2. Antocianinas.....	10
2.3. Carotenóides.....	16
3. Objetivo.....	22
4. Materiais .....	22
4.1. Amostras.....	22
4.2. Reagentes.....	23
4.3. Equipamentos.....	24
4.4. Extratos.....	25
4.4.1 Antocianinas.....	25
4.4.2 Carotenóides.....	25

4.5. Análise quantitativa de antocianinas monoméricas.....	26
4.6. Análise quantitativa de carotenóides totais.....	27
4.7. Análises por HPLC-DAD-MS/MS.....	27
4.7.1 Antocianinas.....	27
4.7.2 Carotenóides.....	29
5. Resultados e discussão.....	30
5.1. Características físicas e químicas da arçaúna.....	30
5.2. Teores de antocianinas monoméricas e carotenóides totais.....	32
5.3. Composição de pigmentos.....	34
5.3.1. Composição de antocianinas.....	34
5.3.2. Composição de carotenóides.....	38
6. CONCLUSÃO GERAL.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1	Composição de antocianinas de frutas da família Myrtaceae.....	7
Tabela 2	Composição de carotenóides de frutas da família Myrtaceae .....	8
Tabela 3	Valores das características físico-químicas da araçáúna.....	31
Tabela 4	Teores de antocianinas monoméricas e de carotenóides totais em araçáúna.....	32
Tabela 5	Características cromatográficas e espectroscópicas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, e composição das antocianinas de araçáúna..	36
Tabela 6	Características cromatográficas e espectroscópicas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, e composição de carotenóides de araçáúna....	40
Tabela 7	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ ) de carotenóides em diferentes lotes de araçáúna.....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>Psidium eugeniaefolia</i> .....	10
Figura 2	Estruturas das antocianidinas mais comuns em alimentos.....	11
Figura 3	Transformações estruturais das antocianinas em solução aquosa.....	13
Figura 4	Estruturas de alguns carotenóides.....	18
Figura 5	Estruturas de isômeros <i>cis</i> de $\beta$ -caroteno encontrados em frutas e vegetais.....	19
Figura 6	Cromatograma, obtido por HPLC-DAD do extrato de antocianinas de araçáúna.....	35
Figura 7	Cromatograma, obtido por HPLC-DAD do extrato de carotenóides de araçáúna.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AM	antocianinas monoméricas
APCI	ionização química a pressão atmosférica
b.s.	base seca
b.u.	base úmida
cyd 3-glu	cianidina 3-glucosídeo
DAD	detector de arranjo de diodos
ESI	ionização por <i>eletrospray</i>
FD	fator de diluição
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
MeOH	metanol
MS	espectrometria de massas
MTBE	éter metil-terc-butílico
$^1\text{O}_2$	oxigênio molecular no estado singlete
%III/II	estrutura fina espectral
% $A_B/A_{II}$	intensidade de pico <i>cis</i>
$\epsilon$	absortividade molar [L/mol.cm]
$E_{1cm}^{1\%}$	coeficiente de absortividade [100 mL/g.cm]

## RESUMO

Os pigmentos naturais, entre os quais se destacam antocianinas e carotenóides, proporcionam cor aos alimentos. A cor percebida é considerada um fator de qualidade e um atributo fundamental na aceitação e escolha de um alimento. Em paralelo, estes pigmentos também possuem importantes funções biológicas, sendo considerados promotores da saúde humana. A araçauína (*Psidium eugeniaefolia*) é uma fruta de cor roxa, de sabor exótico e mede até 3 cm de diâmetro, encontrada na região da Mata Atlântica, desde o Estado do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul. Por se tratar de uma fruta pouco pesquisada objetivo do presente trabalho foi caracterizar e quantificar as antocianinas e os carotenóides. A composição de carotenóides e de antocianinas foi determinada em três lotes de araçauína coletados no município de Santa Maria de Jetibá, Estado do Espírito Santo. Os lotes apresentaram em média entre 3,0 e 3,2 mg/g de antocianinas, entre as quais se destaca cianidina 3- glucosídeo (74%). Em relação aos carotenóides, o conteúdo variou entre 30,0 e 35,4 µg/g, sendo os carotenóides majoritários a luteína (49-53%), seguido de β-caroteno (13%). Esses pigmentos foram separados, identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo e diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS/MS).

## SUMMARY

The natural pigments, mainly anthocyanins and carotenoids, promote color to food. The perceived color is considered a factor of quality and a key attribute of acceptance and choice of this food. Additionally, these pigments also present remarkable biological functions and are considered promoters of the human health. Araçáúna (*Psidium eugeniaefolia*) is a purple fruit, presenting an exotic flavor and it is up to 3 cm in diameter. They are found in the Atlantic Forest region, from Espírito Santo State to Rio Grande do Sul State, Brazil. Taking in consideration that few reports are found in literature about this fruit, the aim of this work was to characterize and quantify anthocyanins and carotenoids. The composition of carotenoids and anthocyanins were determined in three batches of araçáúna collected from Santa Maria de Jetibá, Espírito Santo State. The batches presented concentration between of 3.0 and 3.2 mg/g (dry basis) of anthocyanins, where cyanidin 3 - glucoside was the major one (74%). Regarding the carotenoid content, it ranged between 30.0 and 35.4 mg/g (dry basis), where the main carotenoids were lutein (49-53%), followed by  $\beta$ -carotene (13%). These pigments were separated, identified and quantified by high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector and tandem mass spectrometer (HPLC-DAD-MS/MS).

## 1. Introdução Geral

Os pigmentos naturais, tais como antocianinas e carotenóides, presentes naturalmente nos alimentos, ou adicionados propositalmente, proporcionam cor aos alimentos, contribuindo no aspecto visual, atributo este, de fundamental importância na aceitação e escolha de um alimento por seus consumidores (Clydesdale, 1993). Já é reconhecida a associação entre a alta ingestão de frutas e vegetais e a diminuição do risco de desenvolvimento de diversas desordens crônico-degenerativas, tais como câncer, inflamações, doenças cardiovasculares, catarata, degeneração macular e outras, sendo os pigmentos um dos grupos de compostos bioativos aos quais são atribuídas tais ações. Os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados, mas de maneira geral, a redução do risco dessas doenças envolve a redução ou inibição de reações de oxidação, através do seqüestro de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de espécies reativas de nitrogênio (RNS) que são geradas em decorrência do metabolismo aeróbico celular normal, do desencadeamento de processos oxidativos, em que atuam como um mensageiro intracelular, ou ainda de fontes externas (Martindale, 2002, Machado, 2010).

Os numerosos estudos existentes mostraram que os compostos fenólicos, incluindo antocianinas que são pigmentos responsáveis pela coloração que varia do vermelho ao azul em muitas frutas, vegetais e flores, estão associados com ações anti-carcinogênicas (inibição do câncer de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele), anti-inflamatórias, anti-hepatotóxica, anti-viral, anti-alérgica e anti-trombótica (Mazza & Girard, 1998), Além disso, estes compostos estão relacionados com prevenção da oxidação de

lipoproteínas de baixa densidade, diminuindo os riscos da aterosclerose, atuando na prevenção de doenças cardiovasculares e na absorção de produtos tóxicos oriundos da peroxidação lipídica (Chiang et al., 2004; Dubick & Omaye, 2001; Gorelik et al., 2008). Estas funções estão provavelmente relacionadas a capacidade antioxidante destes compostos.

A capacidade antioxidante das antocianinas se deve à sua habilidade de seqüestrar radicais livres, pela doação de hidrogênio ou elétrons, ou pela quelatação de íons metálicos bivalentes (Amarowicz et al., 2004). Além disso, De Rosso et al. (2008) relataram que as antocianinas na forma colorida de cátion flavilium são também boas desativadoras de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). Recentemente, Ribeiro et al. (2010) comprovaram que o tratamento agudo e sub-agudo com polpa de açaí possui efeito protetor em relação aos efeitos genotóxicos causados pelo agente tumorígeno doxorubicina em ratos. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) mostraram que na polpa de açaí predomina a presença de flavonóides e de antocianinas, além de pequenas quantidades de carotenóides. Esse efeito protetor pode ser atribuído à presença desses compostos com ação antioxidante que diminuem a quantidade de ROS gerados pela doxorubicina.

Os carotenóides são pigmentos que apresentam coloração que varia do amarelo ao vermelho e são encontrados em vegetais, animais e em microrganismos. Estes compostos possuem como principal característica estrutural uma série de ligações duplas conjugadas, gerando por ressonância um sistema de elétrons  $\pi$  que se desloca sobre toda a cadeia poliênica, proporcionando a estas substâncias alta reatividade química, absorção de luz

na região do visível e atividade antioxidante. Carotenóides com mais que sete ligações duplas conjugadas são capazes de desativar  $^1\text{O}_2$  por transferência de energia (Di Mascio et al., 1989). Os carotenóides também desativam os estados tripletes excitados de sensitizadores (Montenegro et al., 2004), os quais são responsáveis pela formação de  $^1\text{O}_2$ . Alguns estudos também têm mostrado que os carotenóides desativam o radical livre estável  $\text{ABTS}^{*\cdot}$ , sendo o licopeno mais efetivo que  $\beta$ -caroteno (Miller et al., 1996; Bohm et al., 2002).

O Brasil apresenta a maior diversidade biológica do planeta (Rímoli et al., 2000), entretanto a composição de pigmentos e flavonóides de várias frutas cultivadas no Brasil ainda não foi avaliada e em muitas das já analisadas, a identificação dos carotenóides, antocianinas e flavonóides não foi confirmada por espectrometria de massas (MS).

Dentro deste contexto se encaixam algumas frutas, como a araçáúna (*Psidium eugeniaefolia*), também conhecida como araçá preto, pertencente à família Myrtaceae. Sua ocorrência se concentra na bacia do rio Paraná e em toda a extensão da Mata Atlântica do Estado do Espírito Santo ao Estado do Rio Grande do Sul. Os frutos apresentam forma arredondada, chegando a 3 cm de diâmetro, e a coloração da casca varia entre verde, púrpura e chega a quase negro, de acordo com a maturação, sugerindo a presença de antocianinas. A polpa é carnosa, arroxeadada, levemente ácida e adocicada envolvendo de 4 a 7 sementes. No Estado do Espírito Santo, a araçáúna é utilizada atualmente na indústria de sorvetes e na fabricação de produtos artesanais como licores, geléias, podendo também ser consumida *in natura*.

Não foram encontrados trabalhos na literatura que descrevam a composição centesimal de araquína, bem como a composição de carotenóides e antocianinas.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Composição de carotenóides e antocianinas em frutas da família**

#### **Myrtaceae**

Myrtaceae é uma família pantropical, com aproximadamente 3.800 espécies distribuídas em 130 gêneros, encontradas na maioria das formações vegetais brasileiras. É uma família de alta representatividade na flora brasileira, onde existem cerca de 1000 espécies encontradas nas áreas serranas dos domínios do Cerrado e principalmente na Floresta Atlântica, onde predominam (Landrum & Kawasaki, 1997). Muitas espécies de frutas dessa família já foram estudadas profundamente, destacando-se a investigação do conteúdo de compostos fenólicos e também de carotenóides, em especial nos exemplares que apresentam intensa coloração atraente como amarelo, vermelho e roxo. Dentre as espécies mais pesquisadas estão pitanga (*Eugenia uniflora* L.)(Azevedo-Meleiro & Rodriguez-Amaya, 2004; Bagetti et al., 2011), jabuticaba (Montes et al., 2005; Reynertson, 2006), camu-camu (Zanatta & Mercadante, 2007; Gonçalves et al., 2010; Akter et al., 2011), jambolão (*Syzygium cumini*) (Faria et al. 2011) e goiaba (Ferreira & Rodriguez-Amaya, 2008; Correa et al., 2011).

A tabela 1 apresenta algumas frutas representantes da família Myrtaceae em que o conteúdo de antocianinas já foi investigado. Em seguida, a tabela 2 mostra alguns representantes dessa família e o conteúdo de carotenóides que apresentam.

De acordo com os dados apresentados nas tabelas, o conteúdo de antocianinas e de carotenóides apresenta grande variação entre as espécies da mesma família e até mesmo em frutas da mesma espécie. Essa variação é provavelmente consequência não só do cultivar, como também do local onde foram cultivadas, das condições do solo e do clima, e do estágio de maturação das frutas no momento das análises (Mercadante, 2008). O camu-camu (*Myrciaria dubia*), por exemplo, uma fruta de origem amazônica e sabor exótico, possui uma grande variação no conteúdo de pigmentos de acordo com o local onde foi coletado. Esta é uma consequência não somente do local onde foi cultivado, bem como alterações que podem ter ocorrido durante o transporte e armazenamento, e o estágio de maturação no período da colheita de acordo com as práticas adotadas por cada produtor na tentativa de manter a qualidade das frutas para comércio *in natura*. Nesse caso, por exemplo em camu-camu adquirido em duas cidades brasileiras distintas do Estado de São Paulo apresentam quase 50% de variação quanto ao conteúdo de antocianinas dependendo da origem (Zanatta & Mercadante, 2007). Quando comparado com as frutas adquiridas no Estado da Flórida, EUA (Reynertson et al., 2008) a quantidade de pigmentos do camu-camu brasileiro é muito superior. Esta variação também pode ser percebida com o jambolão (*Syzygium cumini*). As frutas obtidas na Flórida (Reynertson et al., 2008) apresentaram um conteúdo

de antocianinas três vezes maior do que os exemplares de origem brasileira (Pelotas, Rio Grande do Sul) (Faria et al., 2011). Lima et al. (2002) avaliaram pitangas de Paratibe – Estado de Pernambuco, e observaram que pitangas maduras e semi-maduras possuem conteúdo de carotenóides diferentes.

**Tabela 1** – Composição de antocianinas de frutas da família Myrtaceae.

Frutas	Local de coleta das amostras	Antocianinas (mg/g)	Referência
Muntries ( <i>Kunzea pomifera</i> )	South Australia, Austrália	0,38 ± 0,03 <sup>a</sup>	Netzel et al. (2006)
Cedar Bay cherry ( <i>Eugenia carissoides</i> F. Muell.)	New South Wales, Austrália	0,43 ± 0,01 <sup>a</sup>	Netzel et al. (2006)
Cereja do Rio Grande ( <i>Eugenia aggregata</i> )	Flórida, Estados Unidos da América	1,26 ± 0,45 <sup>b</sup>	Reynertson et al. (2008)
Grumixama ( <i>Eugenia brasiliensis</i> )	Flórida, Estados Unidos da América	8,37 ± 0,20 <sup>b</sup>	Reynertson et al. (2008)
Jabuticaba ( <i>Myrciaria cauliflora</i> )	Flórida, Estados Unidos da América	2,78 ± 0,17 <sup>b</sup>	Reynertson et al. (2008)
Camu-camu ( <i>M. dubia</i> )	Flórida, Estados Unidos da América	≤ 0,01 <sup>b</sup>	Reynertson et al. (2008)
	Mirandópolis e Iguape, SP, Brasil	0,30–0,54 <sup>a</sup>	Zanatta et al. (2005)
Jabuticaba azul ( <i>M. vexator</i> )	Flórida, Estados Unidos da América	6,84 ± 0,36 <sup>b</sup>	Reynertson et al. (2008)
	Flórida, Estados Unidos da América	6,33 ± 0,10 <sup>b</sup>	Reynertson et al. (2008)
Jambolão/ Jamelão ( <i>Syzygium cumini</i> )	Pelotas, RS, Brasil	2,11 ± 0,09 <sup>a</sup>	Faria et al. (2011)
Lipote ( <i>S. curranii</i> )	Flórida, Estados Unidos da América	12,1 ± 0,53 <sup>b</sup>	Reynertson et al. (2008)
Jambo vermelho ( <i>S. malaccense</i> )	Flórida, Estados Unidos da América	≤ 0,01 <sup>b</sup>	Reynertson et al. (2008)
Jambo rosa ( <i>S. samarangense</i> )	Flórida, Estados Unidos da América	0,07 ± 0,03 <sup>b</sup>	Reynertson et al. (2008)
Jambo rosa ( <i>S. samarangense</i> var. <i>Taiwan Pink</i> )	Flórida, Estados Unidos da América	1,35 ± 0,10 <sup>b</sup>	Reynertson et al. (2008)
Araçá Vermelho ( <i>Psidium cattleianum</i> Sabine)	Pelotas, RS, Brasil	0,361 ± 0,005 <sup>a</sup>	Fetter et al. (2010)

<sup>a</sup> Conteúdo expresso como cyd-3 glu base úmida

<sup>b</sup> Conteúdo expresso como cyd-3 glu base seca

**Tabela 2** – Composição de carotenóides de frutas da família Myrtaceae <sup>a</sup>.

<b>Frutas</b>	<b>Local de coleta das amostras</b>	<b>Carotenóides (µg/g)</b>	<b>Referência</b>
Camu-camu ( <i>Myrciaria dúbia</i> )	Mirandópolis e Iguapé, SP, Brasil	3,55 ± 2,60 – 10,95 ± 2,37	Zanatta & Mercadante (2007)
Goiaba ( <i>Psidium guajava L.</i> )	Recife , PE, Brasil	42,98 ± 0,46	Mélo et al. (2006)
Araçá-amarelo ( <i>Psidium cattleyanum Sabine</i> )	Pelotas, RS, Brasil	0,99 ± 0,16	Fetter et al. (2010)
Pitanga roxa ( <i>Eugenia uniflora L</i> )	Paratibe, PE, Brasil	98,0 ± 1,0 - 111,2 ± 2,0	Lima et al. (2002)

<sup>a</sup> Conteúdo expresso em base úmida

Entre as frutas de mirtáceas brasileiras destaca-se a araçáúna (*Psidium eugeniaefolia*) (Figura 1-a), cuja árvore pode atingir de 2 a 6 metros de altura. Sua ocorrência se concentra na bacia do rio Paraná e em toda a extensão da Mata Atlântica dos Estados do Espírito Santo ao do Rio Grande do Sul. Os frutos apresentam forma arredondada, chegando a 3 cm de diâmetro, e a coloração da casca varia entre verde, púrpura e chega a quase negro, de acordo com a maturação, sugerindo a presença de antocianinas (Figura 1-b). A polpa é carnosa, arroxeada, levemente ácida e adocicada envolvendo de 4 a 7 sementes e possui um sabor exótico, (Figura 1-c). A araçáúna é utilizada na indústria de sorvetes e na fabricação de produtos artesanais como licores, geléias, sendo já consumida *in natura*, com grande potencial de comercialização. Não foram encontrados trabalhos na literatura que relatem a composição de seus compostos bioativos, especialmente antocianinas e carotenóides.



**Figura 1-** *Psidium eugeniaefolia* a) árvore em Santa Maria de Jetibá – ES- Brasil, b) árvore com frutas antes da retirada c) Corte transversal da aração.

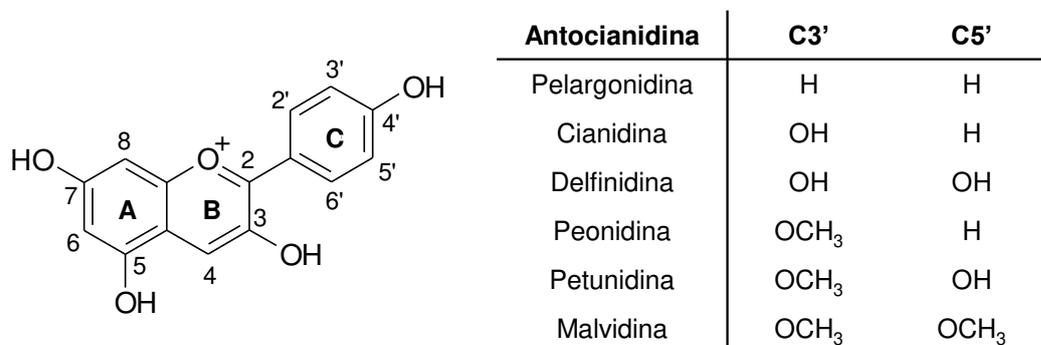
## 2.2 Antocianinas

### *Estrutura química*

As antocianinas constituem um grupo de destaque dentre as classes de flavonóides, uma vez que possuem coloração atraente que varia entre rosa pálido, vermelho, violeta e azul escuro em muitas flores, frutas e folhas de angiospermas (Andersen & Jordheim, 2006).

Quimicamente esses flavonóides são estruturas polihidroxiladas e polimetoxiladas derivadas do cátion flavílium, sendo encontrados na natureza na sua forma glicosilada (Mazza & Miniati, 1993). Diferentes ácidos podem estar ligados a

esses açúcares, contribuindo para a diferenciação entre as antocianinas (Strack & Wray, 1994). As antocianidinas (ou agliconas) consistem de um anel aromático [A] ligado ao um anel heterocíclico [C], e ambos são ligados por ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático [B] (Konczac & Zhang, 2004). Assim, a diferença entre cada antocianina está no grau de metoxilação e hidroxilação do cátion flavilium (aglicona), na natureza e a quantidade de açúcares ligados à molécula, além posição em que se encontram, e à presença de ácidos aromáticos ou alifáticos ligados ao açúcar. Uma vez que as agliconas podem estar ligadas a diferentes açúcares e ácidos, em diferentes posições, o número de antocianinas é muito maior que o número de antocianidinas. Em alimentos 6 agliconas são mais comumente encontradas, sendo estas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina, conforme mostrado na Figura 2, onde também são mostrados o sistema de numeração e a identificação dos anéis.



**Figura 2.** Estruturas das antocianidinas mais comuns em alimentos. As colunas C3' e C5' correspondem aos grupos funcionais ligados aos carbonos 3' e 5', respectivamente.

Os açúcares normalmente ligados às antocianidinas são glucose, galactose, ramnose e arabinose. Estes podem formar di- e trissacarídeos, sendo os monossídeos ligados na posição 3 mais comumente encontrados em alimentos do

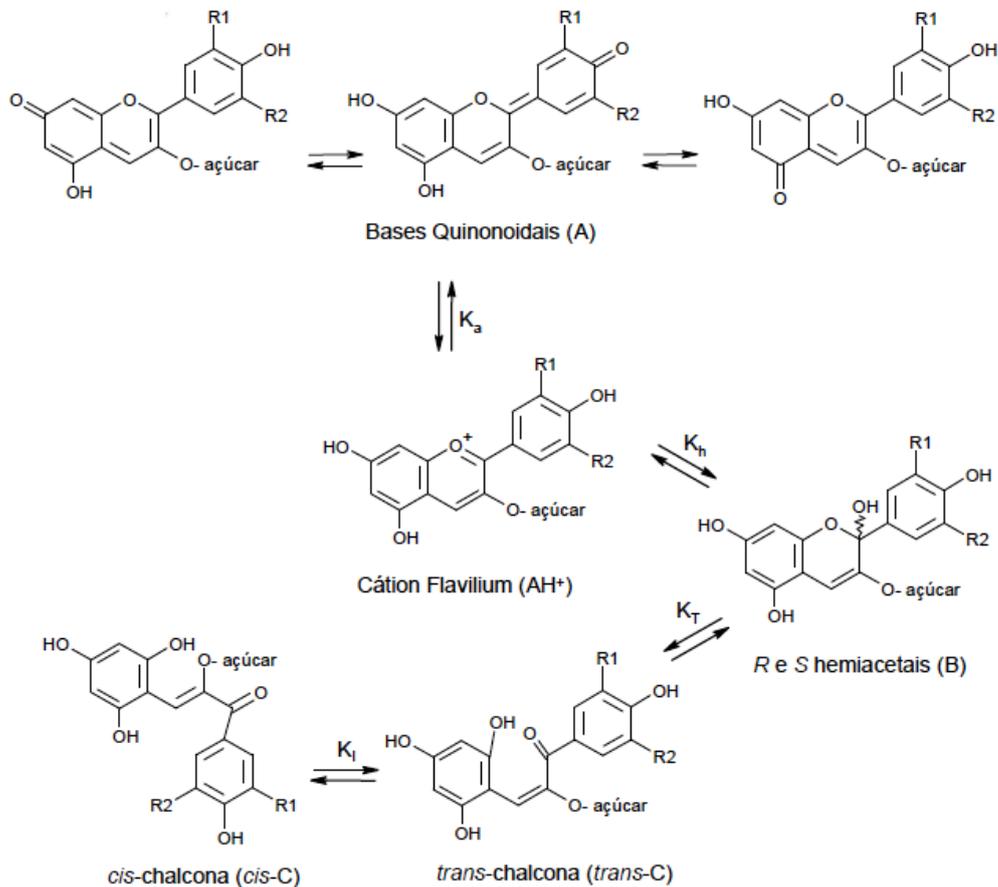
que os ligados nas posições 3,5 e 3,7. Os resíduos de açúcares podem estar esterificados aos ácidos p-coumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, p-hidroxbenzóico, malônico, oxálico, málico, succínico ou acético.

### ***Transformações estruturais***

As antocianinas sofrem transformações estruturais de acordo com o pH do meio em que se encontram, afetando diretamente a cor das mesmas (Vukosavljević et al., 2003; Mercadante & Bobbio, 2008). Já foi amplamente demonstrado que em meio neutro ou levemente ácido, 4 estruturas de antocianinas coexistem em equilíbrio: cátion flavilium ( $AH^+$ ), base quinonoidal (A), carbinol pseudobase (B) e chalcona (C) (Mazza & Miniati, 1993).

Em meio altamente ácido, a estrutura predominante é o cátion flavilium que está positivamente carregado. A carga positiva está deslocalizada nos anéis, embora os carbonos 2 e 4 estejam mais positivamente carregados. A desprotonação dos grupos hidroxilas nas posições 4' e 7 contribui para a mudança de cor nas antocianinas. Em pH próximo de 4, uma dessas hidroxilas perde um próton formando uma base quinonoidal (A). Quando aumenta-se o pH e este está próximo da neutralidade, ocorre uma segunda desprotonação levando a formação de uma base quinonoidal aniônica com um aumento da intensidade da cor azul no espectro de absorção. Além disso, o cátion flavilium é bastante susceptível ao ataque nucleofílico nas posições 2 e 4. Essa reação acontece principalmente na posição 2, ocorrendo então a hidratação do cátion flavilium dando origem a forma hemiacetal incolor que está em equilíbrio com as formas *trans*- e *cis*-chalconas (Mazza &

Brouillard, 1987; Brouillard & Delaport, 1977). A Figura 3 apresenta o esquema das transformações estruturais das antocianinas em solução aquosa.



**Figura 3-** Transformações estruturais das antocianinas em solução aquosa. Adaptado de Mercadante & Bobbio (2008).

As quantidades de cátion flavílium, formas quinonoidais, hemiacetais e chalconas em equilíbrio variam de acordo tanto com o pH quanto com a estrutura das antocianinas (Mazza & Brouillard, 1987; Brouillard et al., 2010). As duas únicas espécies capazes de absorver luz na região do visível são o cátion flavílium e as bases quinonoidais, assim, o grau de coloração em uma solução em um determinado pH está relacionado com a concentração dessas espécies (Brouillard, 1982). Brouillard e Delaport (1977) estudaram a distribuição das formas AH<sup>+</sup>, A, B e

C derivadas de malvidina 3-glucosídeo em função do pH. Com o aumento do pH a forma  $AH^+$ , predominante em valores de pH entre 0 – 2,5, diminui chegando a próximo de 0%, enquanto ocorre o aumento significativo de B, que entre pH 4 e 6, representa cerca de 80 % das formas presentes em solução aquosa, fazendo com que a solução apresente-se praticamente incolor. Porém antocianinas que apresentam um substituinte no carbono 4, como um grupo metila, possuem coloração azul em valores de pH elevado uma vez que a forma A predomina em virtude da estabilização da base quinonoidal pelo substituinte.

### ***Funções das antocianinas***

As antocianinas são um grupo dentro dos flavonóides que estão presentes na alimentação de humanos e animais, possuem pouca ou nenhuma toxicidade, são hidrossolúveis e estão presentes em todos os tecidos vegetais das plantas, existindo uma ampla discussão sobre suas funções e potencialidades. Em flores, as antocianinas (do grego *anthos* = flor e *kianos* = azul) atuam principalmente como atrativo para insetos e outros agentes polinizadores. Estudos também demonstraram que os tipos de antocianidinas biossintetizadas nas flores influenciam diretamente os tipos de insetos que são atraídos por essas plantas (Simmonds, 2003). Em frutas, geralmente esses pigmentos são indicadores da maturação das mesmas, além de contrastarem em um ambiente predominantemente verde em florestas, atraindo pássaros e outros animais que se alimentam dessas frutas e dispersam suas sementes. Uma vez que as antocianinas absorvem luz na região do visível e no UV, e também apresentam capacidade antioxidante, outra possível função também

aceita é de que elas protegem o aparato fotossintético das plantas contra a radiação visível ou UV-B excessiva, bem como contra o estresse foto-oxidativo (Quina et al., 2009).

Baseado em dados obtidos para diversos alimentos, o consumo de antocianinas a partir de dietas ricas em alimentos de origem vegetal é estimado em centenas de miligramas por dia, dependendo dos hábitos alimentares que variam de acordo com a cultura local e de pessoa para pessoa (Hou et al., 2004). Após uma dieta rica em flavonóides, as antocianinas são absorvidas e distribuídas pelo sistema circulatório (Miyazawa et al., 1999). A absorção das antocianinas depende diretamente da sua solubilidade. As antocianinas na forma glicosilada são bastante hidrossolúveis, porém quando ocorre a hidrólise da ligação com os açúcares, a solubilidade diminui modificando o mecanismo de absorção. As antocianidinas por sua vez, podem atravessar as membranas das células por difusão. Quando glicosiladas, os limites da difusão passiva são ultrapassados, e as antocianinas intactas atravessam as membranas por transporte ativo. A absorção dos flavonóides ocorre no intestino delgado, porém uma grande parte não é absorvida, sofrendo metabolismo microbiano no intestino grosso onde os compostos são deglicosilados e as agliconas são sujeitas ao transporte pelo sistema circulatório ou a outras metabolizações. Antocianinas e seus derivados biotransformados foram identificados no plasma, indicando que ambos os caminhos são possíveis. Além do intestino, o estômago também tem sido proposto como um sítio de absorção de antocianinas. Grande parte dos flavonóides é extensivamente metabolizada em humanos, sendo que menos de 10% de dos flavonóides são encontrados intactos na urina indicando uma absorção significativa e extenso metabolismo. A eliminação das

antocianinas é rápida ( $t_{1/2} = 1,5 - 3$  h) e o acúmulo tende a não ocorrer a nível significativo seguindo-se uma dieta normal (Kay, 2006).

Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo moderado de antocianinas devido à ingestão de produtos como vinho tinto está associado a uma diminuição do risco de doenças coronarianas (Sumner et al., 2005; Mazza, 2007). Outras pesquisas demonstram que as antocianinas possuem uma alta capacidade de desativar espécies reativas (Wang et al., 1997; Kalt et al., 2003) e apresentam efeitos inibitórios no crescimento de algumas células cancerígenas (Kang et al., 2003; Chen et al., 2006).

## **2.3 Carotenóides**

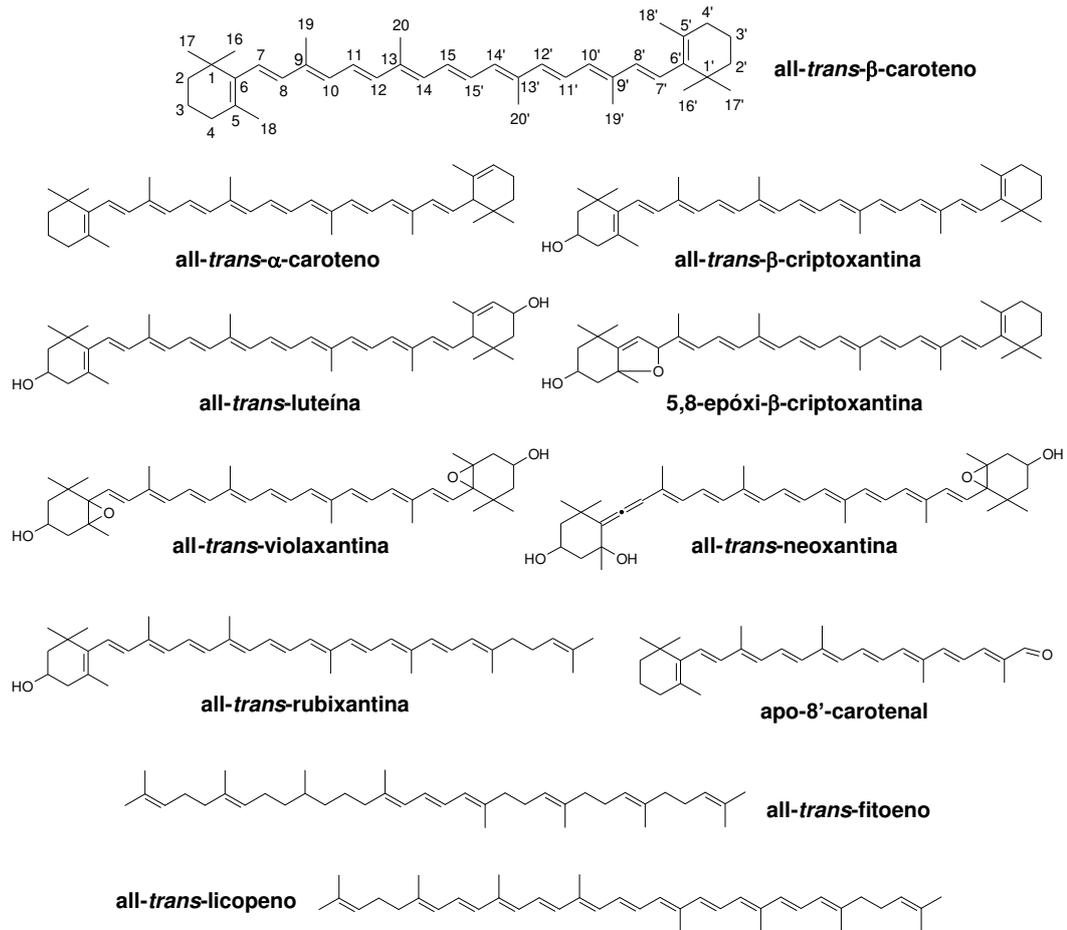
### ***Estrutura química***

Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis responsáveis pela atrativa coloração amarela, laranja e vermelha, encontradas naturalmente em vegetais, microrganismos e animais. Os animais metabolizam os carotenóides a partir de fontes vegetais, não sendo capazes de sintetizá-los. A quantidade de carotenóides presentes em frutas e vegetais depende de diversos fatores, como variedade genética, maturidade, armazenamento pós-colheita e processamento.

Os carotenóides possuem uma estrutura básica de 40 carbonos, formada a partir de 8 unidades de isoprenóides, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro (Figura 4). A estrutura básica acíclica pode ser modificada por hidrogenação, desidrogenação, ciclização, oxidação, ou

ainda rearranjos e encurtamento da cadeia, além da combinação dessas alterações (Davies, 1976). A principal característica dessa estrutura é a alternância de ligações duplas e simples, onde o sistema de elétrons  $\pi$  se desloca sobre a cadeia poliênica que confere alta reatividade química, forma molecular rígida e absorção de luz na região do visível. O número de ligações duplas conjugadas (l.d.c.) existente na molécula caracteriza o cromóforo que afeta diretamente a cor visual que varia entre amarelo e vermelho. Vale ressaltar ainda, que carotenóides com menos de 7 l.d.c. não apresentam cor visível, e quanto mais extenso o cromóforo da molécula, maior o comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (Britton, 1998; Fraser & Bramley, 2004).

Os carotenóides hidrocarbonetos são coletivamente chamados de carotenos, como por exemplo, o  $\beta$ -caroteno, enquanto aqueles que possuem oxigênio em sua estrutura são conhecidos como xantofilas, tais como a luteína, violaxantina, entre outros (Figura 4).



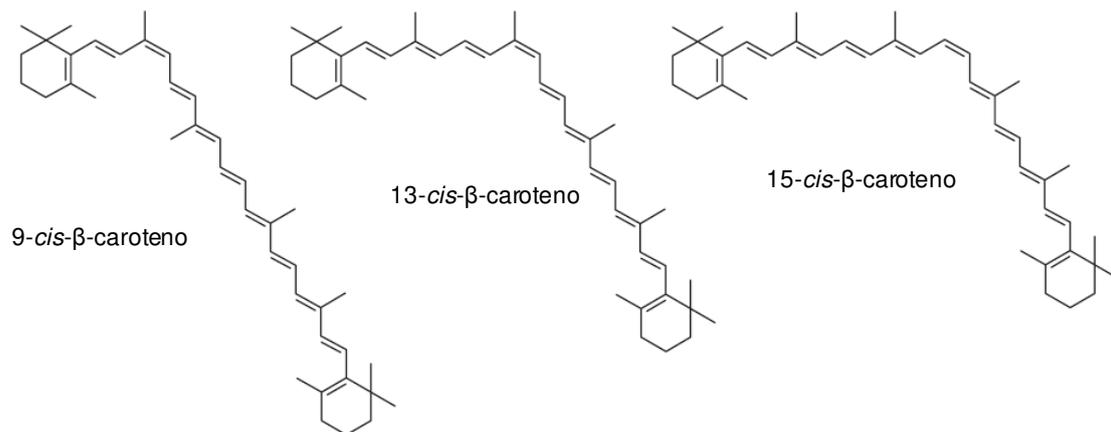
**Figura 4.** Estruturas de alguns carotenóides.

### ***Isomeria cis-trans em carotenóides***

A isomeria *cis-trans* das ligações duplas dos carotenóides é uma de suas importantes características estruturais. Na natureza estão presentes predominantemente carotenóides na sua forma mais estável *all-trans*, embora pequenas quantidades de isômeros *cis* também possam existir. A exposição a ácidos, luz e temperatura também leva à formação dos isômeros *cis*. Essa transformação altera suas propriedades biológicas, como a biodisponibilidade, a

capacidade antioxidante e leva à diminuição da atividade de vitamina A (Shieber & Carle, 2005).

Isômeros *cis* também são encontrados em diversas frutas e vegetais, prevalecendo em folhas verdes, pois a sua presença, principalmente em tecidos fotossintéticos está relacionada com o papel fisiológico dos carotenóides (Godoy & Rodriguez-Amaya, 1994; 1998). De acordo com Mercadante (2008), o 9-*cis*- $\beta$ -caroteno é encontrado em grande quantidade nas folhas verdes comestíveis (10 a 12%), provavelmente porque as clorofilas presentes nesses vegetais agem como sensibilizadores para a foto-isomerização do  $\beta$ -caroteno. A figura 5 mostra a estrutura dos isômeros *cis* de  $\beta$ -caroteno mais amplamente encontrados na natureza.



**Figura 5.** Estruturas de isômeros *cis* de  $\beta$ -caroteno encontrados em frutas e vegetais. Adaptado de Mercadante (2008).

Em 1962, Zechmeister escreveu a primeira revisão sobre isomeria *cis-trans* de carotenóides. De acordo com o número de ligações duplas presentes na molécula, é possível prever o número de formas isoméricas que podem ser formadas a partir da configuração *trans*. Porém, nem todas as conformações previstas são encontradas. Devido ao impedimento estérico, a isomerização nas posições 7-, 7'-, 11- e 11'- da cadeia poliênica dificilmente ocorre, sendo favorecida nas posições 9-, 9'-, 13-, 13'-, 15-, 15'-, onde este impedimento não acontece.

### ***Funções dos carotenóides***

Os carotenóides estão envolvidos em diversos aspectos na fotossíntese, e por isso nas células vegetais estão presentes nos plastídeos, mais especificamente nos cloroplastos, cromoplastos e nas membranas tilacóides. Nos cloroplastos esses pigmentos estão associados principalmente às proteínas como pigmentos fotoprotetores e estabilizadores de membrana, enquanto nos cromoplastos são encontrados na forma cristalina ou na forma de gotículas oleosas. Especificamente na membrana tilacóide eles contribuem para manter a fluidez adequada das membranas. A presença de carotenos colabora para diminuir a viscosidade na membrana, enquanto as xantofilas aumentam a viscosidade. Suas principais funções durante a fotossíntese são absorver a luz, transferir energia para a clorofila e desativar espécies reativas, como oxigênio singlete. Os carotenóides também possuem um importante papel na fotoproteção das plantas, em virtude da alta densidade de elétrons na sua estrutura (Mimuro & Katoh, 1991; Schieber & Carle, 2005).

A vitamina A é essencial para o crescimento normal e desenvolvimento do corpo humano, tendo um importante papel na visão, reprodução, divisão e diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário. Também ajuda a regular o sistema imune na produção de linfócitos, prevenindo o organismo contra doenças infecciosas, além de atacar vírus e bactérias (Gester, 1993). A vitamina A oriunda dos alimentos é derivada do retinol ou é formada a partir dos carotenóides. Porém para que estes apresentem atividade de pró-vitamina A devem possuir em sua estrutura um anel- $\beta$  não substituído, com uma cadeia poliênica de 11 carbonos. Desta forma, destacam-se alimentos como couve, cenoura, buriti e a palmeira-de-óleo-americana (*Elaeis oleifera*) (Mercadante, 2008).

Além de serem precursores da vitamina A, os carotenóides possuem um importante papel na prevenção de doenças e na manutenção da saúde, devido também à sua capacidade de desativar espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, especialmente oxigênio singlete (Rao & Rao, 2007, Biehler, 2011). Já foram reportados na literatura diversos estudos que relacionam o consumo de carotenóides com a diminuição do risco de doenças cardiovasculares (Palace et al., 1999; Voutilainen, 2006), doenças oculares relacionadas com danos oxidativos induzidos pela luz e idade (Bernstein et al., 2001) e certos tipos de cânceres (Maoka et al., 2001; Kristal, 2004). Porém, alguns estudos realizados com suplementação desses compostos mostraram efeitos opostos, sendo necessárias pesquisas mais profundas para elucidar a relação entre a ingestão de carotenóides e seu potencial benefício através da diminuição do estresse oxidativo tanto em pessoas saudáveis como em pessoas submetidas a determinados fatores de risco como o tabagismo (Catania et al., 2009, Krinsky & Johnson, 2005).

### **3. Objetivo**

Considerando que o Brasil é o terceiro país em produção mundial de frutas, a enorme biodiversidade encontrada e o apelo comercial cada vez maior de ingredientes naturais e funcionais, o objetivo foi caracterizar e quantificar as antocianinas e os carotenóides de aração. Para atingir tal objetivo foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência conectada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS/MS).

### **4. Materiais**

#### **4.1 Amostras**

Em maio de 2011, 3 lotes de aproximadamente 3 kg cada foram coletados no município de Santa Maria de Jetibá, Estado do Espírito Santo (20°03'15,34" S; 40°46'26,11" W). Todos os lotes foram coletados no mesmo mês com intervalo de uma semana entre as coletas. Além disso, as frutas foram selecionadas com base no estágio de maturação, avaliada de acordo com a coloração da casca, selecionando-se aquelas que possuíam entre 90 e 100% de coloração roxa intensa. As frutas foram enviadas em recipientes apropriados por transporte aéreo ao laboratório de Química de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp. Após a recepção das embalagens lacradas, as frutas contendo injúrias e em estado insatisfatório foram descartadas.

Em cada lote recebido, 50 frutas foram aleatoriamente selecionadas para a determinação das características físico-químicas, como diâmetro transversal e

longitudinal, peso da fruta inteira, peso da fruta sem sementes, além das determinações de pH, sólidos solúveis totais e umidade, de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, com auxílio do software STATISTICA 8.0.

As demais frutas do restante do lote, aproximadamente 1,8 kg, foram cortadas ao meio, suas sementes foram retiradas, e o restante (polpa e casca) imediatamente congelado criogenicamente com nitrogênio líquido. Após o congelamento rápido, as frutas foram armazenadas em um freezer a -80 °C até serem liofilizadas em um liofilizador de bancada (Liotop L101, Liobras, Brasil). Depois de secas, as frutas foram transformadas em pó em um miniprocessador de alimentos (Black & Decker, HC31, Brasil), seguido de armazenamento a vácuo em sacos plásticos de polietileno estocados a -36 °C até o momento das análises.

## **4.2. Reagentes**

Para as análises por HPLC, todos os solventes utilizados foram de grau cromatográfico e previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo, com membrana para solvente orgânico ou aquoso, conforme o caso, com porosidade de 0,45 µm. Os extratos submetidos à separação por HPLC também foram filtrados em membrana de polietileno com 0,22 µm de poro. Metanol (MeOH) e éter metil *terc*-butílico (MTBE) para uso em HPLC foram adquiridos da Merck (Alemanha). A água destilada utilizada como fase móvel e para preparo dos extratos foi purificada pelo Milli-Q (Millipore, EUA).

Os demais solventes, ácidos e sais foram adquiridos da Labsynth (Brasil).

### 4.3. Equipamentos

As análises físico-químicas foram realizadas em pHmetro marca Digimed (Brasil) previamente calibrado com soluções tampão 4 e 7, paquímetro digital (Insize, Brasil) e estufa de secagem para determinação da umidade (Modelo 315 E, Fanem, Brasil).

Para a secagem dos extratos foi utilizado um evaporador rotatório Büchi (Suíça).

As análises quantitativas de carotenóides totais e de antocianinas monoméricas foram realizadas em espectrofotômetro com detecção por arranjo de diodos, marca Agilent modelo 8453 (EUA). Todas as análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida da marca Shimadzu (modelo LC-20AD, Japão), com sistema quaternário de bombeamento de solventes, injetor *Rheodyne* com alça de amostra de 20  $\mu$ L, forno externo com controle de temperatura e desgaseificador *on line*, conectado ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) e a um espectrômetro de massas (MS/MS) (Esquire 4000, Bruker, Alemanha), com interfaces de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e de ionização por *eletrospray* (ESI), além do analisador *ion trap*. Os dados obtidos pelo DAD e pelo espectrômetro de massas foram adquiridos e processados por meio dos *softwares* LC-Solution e Esquire Control, respectivamente.

## **4.4 Extratos**

### **4.4.1. Antocianinas**

A partir de 0,2 g de araquáua liofilizada foi realizada a extração das antocianinas com uma solução composta por 1% de HCl em metanol, em repouso, à temperatura de 4 °C durante a noite, seguida de maceração exaustiva com o mesmo solvente e filtração em papel Whatman nº1 (De Rosso & Mercadante, 2007a). Na seqüência, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório ( $T < 38$  °C) até completa evaporação do metanol, liofilizado e armazenado sob atmosfera de nitrogênio no escuro a -36 °C. As extrações de cada lote foram realizadas em triplicata.

### **4.4.2. Carotenóides**

Os carotenóides foram extraídos exaustivamente em triplicata, a partir de 3,5 g de fruta liofilizada. A fruta seca foi pesada e macerada com acetato de etila em um almofariz seguida de filtração em funil de Büchner com papel. Esse procedimento foi repetido três vezes. Em seguida o extrato foi saponificado para hidrolisar os ésteres de xantofilas utilizando uma solução de 10% de KOH (100 mL) em metanol à temperatura ambiente, totalizando um volume final de aproximadamente 200 mL. A solução final permaneceu em uma mesa agitadora por uma noite. O extrato saponificado foi transferido para uma mistura de éter etílico e éter de petróleo (2:1, v/v), onde foi lavado com água destilada até completa eliminação do álcali. O resíduo de água que permaneceu no extrato foi retirado com auxílio de sulfato de

sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). O extrato foi concentrado até securo em evaporador rotatório ( $T < 35 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e armazenado sob atmosfera de nitrogênio no escuro a  $-36 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.5. Análise quantitativa de antocianinas monoméricas

O extrato obtido no item 4.4.1 foi transferido para um balão volumétrico e o volume do mesmo completado com água acidificada (1% HCl). Duas alíquotas foram retiradas, sendo uma delas diluída em tampão cloreto de potássio 0,025 M, pH 1,0, e a outra em tampão acetato de sódio 0,4 M, pH 4,5, seguidas de leitura da absorbância a 520 nm e 700 nm. A diluição ocorreu em uma proporção de 3:17 (extrato antociânico: solução tampão). O conteúdo de antocianinas monoméricas (AM) foi calculado levando-se em consideração a diferença de absorbância entre as leituras dos extratos em pH 1,0 e pH 4,5, conforme a equação 1, onde  $A_{520}$  e  $A_{700}$  são as absorbâncias a 520 e 700 nm, respectivamente; FD é o fator de diluição e  $l$  e caminho ótico em cm.

$$AM = \frac{[(A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4,5}] \times M \times FD \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad (\text{eq. 1})$$

Os resultados foram expressos como equivalente de cianidina 3-glucosídeo (cyd 3-glu), considerando massa molar ( $M$ ) de 449,2 g/mol e absortividade molar ( $\epsilon$ ) de 26900 L/mol.cm e caminho ótico da cubeta de 1 cm (Lee, 2005).

#### 4.6. Análise quantitativa de carotenóides totais

O extrato seco de carotenóides obtido no item 4.4.2 foi ressuspenso em etanol e o volume completado para 125 mL, de modo a se obter uma diluição adequada para a leitura no espectrofotômetro. O conteúdo total de carotenóides foi calculado segundo a equação 2, considerando-se para este cálculo o valor obtido para a absorvância (abs) no comprimento de onda de 445 nm. FD é o fator de diluição, e valor do coeficiente de extinção ( $E_{1cm}^*$ ) de 2550 para luteína em etanol, de acordo com Davies (1976), uma vez que este é o carotenóide majoritário presente na araquína.

$$\text{Carotenóides totais } (\mu\text{g}) = \frac{\text{abs} \times \text{FD} \times 10^4}{E_{1cm}^*} \quad (\text{eq. 2})$$

#### 4.7. Análises por HPLC-DAD-MS/MS

##### 4.7.1. Antocianinas

Antes da análise por HPLC-DAD-MS/MS os extratos foram purificados em uma coluna XAD-7 de 45 cm de altura e 5 cm de diâmetro (Sigma-Aldrich, EUA), conforme método descrito por Degenhardt et al. (2000) e aplicado para dovyalis por De Rosso & Mercadante (2007b).

Após a extração das antocianinas, retirou-se compostos lipossolúveis do extrato, fazendo-se a partição em um funil de separação contendo 100 mL de acetato de etila. Então, o extrato antociânico foi transferido para a coluna XAD-7, previamente lavada com água ultrapura. A coluna foi novamente lavada com cerca de 1 L de água milli-Q, ficando as antocianinas retidas na resina, enquanto os

açúcares e outros flavonóides foram eluídos. Para a remoção das antocianinas foi utilizado 1 L de solução ácido acético em água (19:1). Após eluir com a solução ácida, o extrato foi concentrado em um evaporador rotatório e em seguida liofilizado. Antes das análises, o extrato foi ressuspenso em uma solução equivalente a fase móvel utilizada na separação, na proporção de 90:10 de água e metanol, ambos com 5% de ácido fórmico.

As antocianinas do extrato de araçáua foram separadas em coluna C<sub>18</sub> Luna (5 µm, 250 x 4,6 mm i.d.) (Phenomenex, EUA) com temperatura mantida em 29 °C. A fase móvel foi constituída de um gradiente linear de água/metanol, ambos com 5% de ácido fórmico, programado para iniciar com a proporção de 90:10 e seguir para 60:40 em 20 min, mudar para 20:80 em 15 min e manter essa proporção por 5 min, eluindo com um fluxo de 0,9 mL/min. Os espectros de absorção UV-visível foram adquiridos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas processados em 280, 320, 360 e 520 nm.

No espectrômetro de massas foi utilizada a fonte ESI e os parâmetros utilizados foram ionização no modo positivo, temperatura da fonte de 325 °C, temperatura do gás de secagem (N<sub>2</sub>) de 350 °C, com fluxo de 8L/min e pressão do nebulizador de 30 psi. A energia de fragmentação do MS/MS foi 1,2 V em modo automático de seleção para fragmentação. O espectro de massas foi adquirido na faixa de *m/z* 200 a 800 (Faria et al., 2011).

Para a identificação das antocianinas foram considerados os seguintes parâmetros: ordem de eluição dos picos, as características do espectro UV-visível, dados da literatura e principalmente as características dos espectros de massas.

O conteúdo total de antocianinas monoméricas (item 4.5) para cada lote foi utilizado como área total e a composição relativa foi determinada a partir da área de cada pico.

#### 4.7.2 Carotenóides

Os carotenóides foram ressuspensos em metanol (MeOH) e MTBE (70:30) e separados em coluna de fase reversa C<sub>30</sub> YMC (5 µm, 250 x 4,6 mm) (Waters, EUA), utilizando como fase móvel um gradiente linear de MeOH e MTBE de 95:5 para 70:30 em 30 minutos e para 50:50 em 20 min (De Rosso & Mercadante, 2007a) com fluxo de 0,9 mL/min e a temperatura foi mantida em 29 °C. Os espectros UV-visível foram adquiridos entre 250 e 650 nm e os cromatogramas processados em 280, 350 e 450 nm. No espectrômetro de massas foi utilizada a fonte APCI e os parâmetros utilizados foram ionização no modo positivo, descarga na corona de 4000 nA, temperatura da fonte de 450 °C, temperatura do gás de secagem (N<sub>2</sub>) de 350 °C, fluxo de 5L/min e pressão do nebulizador de 60 psi. A energia de fragmentação do MS/MS foi 1,4 V em modo automático de seleção para fragmentação. O espectro de massas foi adquirido na faixa de *m/z* 100 a 700 (De Rosso & Mercadante, 2007a).

A identificação dos carotenóides foi realizada com base nos resultados combinados dos seguintes parâmetros: ordem de eluição na coluna C<sub>30</sub>, características do espectro UV-Visível ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), estrutura fina do espectro (%III/II) e intensidade do pico cis (%A<sub>B</sub>/All) e características do espectro de massas (Britton et al., 2004; De Rosso & Mercadante, 2007a, 2007b).

A composição relativa foi determinada partir dos valores obtidos no item 4.6. O conteúdo total de carotenóides foi utilizado como área total e o conteúdo de cada pigmento foi calculado a partir da área de cada pico.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Características físicas e químicas da aração**

As características físico-químicas da aração foram determinadas em 50 frutas aleatoriamente selecionadas de cada lote. As médias calculadas para cada lote estão apresentadas na tabela 3. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 3** – Valores das características físico-químicas da araçauína.

Análise	Lote 1 <sup>b</sup>	Lote 2 <sup>b</sup>	Lote 3 <sup>b</sup>
<b>Diâmetro transversal (mm)</b>	19,6 ± 1,6 <sup>a</sup>	19,0 ± 2,2 <sup>a</sup>	18,0 ± 1,8 <sup>b</sup>
<b>Diâmetro longitudinal (mm)</b>	19,0 ± 3,0 <sup>a</sup>	18,9 ± 2,4 <sup>a</sup>	18,5 ± 1,6 <sup>a</sup>
<b>Peso da fruta inteira (g)</b>	5,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	4,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,9 <sup>b</sup>
<b>Peso da fruta sem sementes (g)</b>	3,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,6 <sup>b</sup>
<b>pH</b>	3,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,18 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>Umidade<sup>a</sup></b>	73,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	73,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	74,3 ± 0,6 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>Média e desvio-padrão das análises em triplicata

<sup>a</sup>Média e desvio-padrão da determinação em quintuplicata expressa em %. Valores com a mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Conforme se pode observar na tabela 3, os frutos do terceiro lote apresentaram diferença significativa a 5% de probabilidade em relação ao diâmetro transversal, peso da fruta inteira, peso da fruta sem sementes, pH e umidade. As diferenças entre o lote 3 e os demais deve-se provavelmente pelas frutas terem sido coletadas no final da safra e parte do material da própria fruta ter sido utilizado na respiração da mesma (Dejong & Walton, 1989). Assim o terceiro lote apresentou tamanho ligeiramente menor. Também foi observado que o peso da fruta sem as sementes representa entre 60 e 65 % da mesma. Este é um importante fator, pois determina o aproveitamento da fruta para a extração dos compostos bioativos, uma vez que foi utilizada somente a polpa junto com a casca, ou seja, a fruta foi utilizada somente após o descarte das sementes. A umidade das frutas variou entre 73,2 e 74,3% entre os lotes, valor inferior em relação a frutos da mesma família com características visuais muito similares. Caldeira et al. (2004) determinaram as características físico-químicas do araçá (*Psidium guineense* SW.) e relataram

umidade de 85,1%, enquanto Donadio et al. (2002) e Haminiuk & Vidal (2002) encontraram em *Psidium cattleianum* 82,6 % e 87,2% de umidade, respectivamente.

## 5.2. Teores de antocianinas monoméricas e carotenóides totais

A tabela 4 apresenta os teores de antocianinas monoméricas e carotenóides totais de cada lote de araçauína.

**Tabela 4** – Teores de antocianinas monoméricas totais e de carotenóides totais em araçauína<sup>a</sup>

Pigmento	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	base seca	base úmida	base seca	base úmida	base seca	base úmida
<b>Antocianinas</b> (mg/g) <sup>b</sup>	3,0 ± 0,4	0,78 ± 0,03	3,2 ± 0,1	0,85 ± 0,02	3,10 ± 0,2	0,79 ± 0,05
<b>Carotenóides</b> (µg/g)	30,6 ± 1,3	7,94 ± 0,34	35,4 ± 0,5	9,41 ± 0,13	30,0 ± 1,0	7,71 ± 0,26

<sup>a</sup>Média e desvio padrão de análise em triplicata.

<sup>b</sup>mg/g de equivalente de cianidina 3-glucosídeo

Reynertson et al. (2008) publicaram um trabalho onde são relatados os conteúdos de compostos fenólicos de 14 frutas da família Myrtaceae. Entre as frutas pesquisadas em algumas espécies foram encontrados possuem valores muito baixos e não-detectáveis de antocianinas como *Eugenia luschnathiana* e *Syzygium jambos*, ainda que a cor possa indicar a presença desses compostos. Em compensação, *S. curranii* apresentou 12,2 mg/g (b. s.) equivalente de cianidina 3-glucosídeo. A jabuticaba que é bem conhecida por seu alto conteúdo de antocianinas, apresentou 2,78 mg/g (b. s.) valor este, abaixo do encontrado para a

araçáúna, o que indica que esta fruta é uma potencial fonte de extração desses pigmentos.

A comparação com outras frutas tropicais é válida, pois embora não pertençam a mesma família elas podem conter um alto teor de antocianinas como o guajiru (9,58 mg/g b. s.) e jussara (29,56 mg/g b. s.) (Britto et al., 2007).

As antocianinas de polpa de açáí foram determinadas por De Rosso et al. (2008). Na região norte do Brasil esta fruta é uma importante fonte desses compostos, possuindo um alto teor desses pigmentos variando entre 282,5 – 303,7 mg /100 g base úmida (b.u.). A araçáúna apresenta um valor mais baixo (78,9 - 85,77 mg/100g b. u.), mas por outro lado a acerola (6,5 – 8,4 mg/ 100 g b.u.) (De Rosso et al., 2008), e o próprio araçá vermelho (36,1 mg/100 g b.u. ) (Fetter et al., 2010), que fisiologicamente é muito similar à araçáúna, possuem teores mais baixos que esta.

As *berries* são pequenas frutas que já foram amplamente estudadas e constituem uma importante fonte de antocianinas em países, principalmente, de clima temperado. A quantidade de antocianinas encontradas em araçáúna pode ser comparada a muitas frutas desse grupo, entre as quais mirtilos, framboesas, morangos e *cranberries*, de acordo com estudos realizados por diversos grupos e sumarizados por Szajdek & Borowska (2008). Por se tratar de uma fruta nativa da Mata Atlântica, a araçáúna pode ser considerada uma importante fonte desses compostos para a região costeira do Brasil.

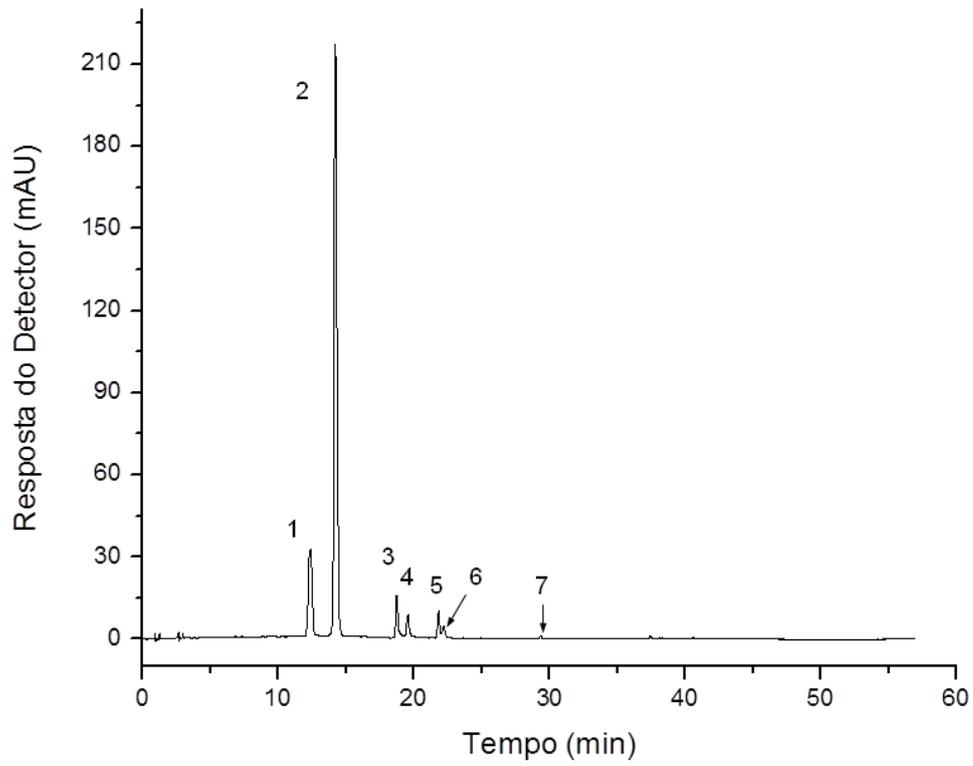
O conteúdo de carotenóides foi bastante expressivo se comparado a outras frutas que apresentam as antocianinas como pigmento majoritário tal como o

jambolão, que apresentou 89,2  $\mu\text{g}/100\text{ g b.u.}$  (Faria et al., 2010). A goiaba, que é um fruto do mesmo gênero, possui, por exemplo, cerca de 4300  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , de acordo com Mélo et al. (2006) que pesquisaram o conteúdo de carotenóides de diversas fontes na cidade de Recife – PE. A araçauína, como mostra a tabela 4 apresentou teores de carotenóides entre 771 – 941  $\mu\text{g}/100\text{ g b. u.}$ , esses valores são intermediários quando comparados com a nêspera, 196 – 3020  $\mu\text{g}/100\text{ b.u.}$  (Faria et al. 2009), a jaca 107,98  $\mu\text{g}/100\text{ b.u.}$  (Faria et al., 2009) e a acerola (370 – 1881  $\mu\text{g}/100$ ) b.u. (De Rosso & Mercadante, 2005) o que ressalta sua importância como fonte desses pigmentos, uma vez que apresenta teores relevantes tanto de antocianinas como de carotenóides.

### **5.3. Composição de pigmentos**

#### **5.3.1. Composição de antocianinas**

A figura 6 apresenta o cromatograma do extrato de antocianinas de araçauína proveniente do lote 1. As frutas dos demais lotes apresentam o mesmo perfil, onde se destaca a presença das antocianinas delphinidina 3-glucosídeo e cianidina 3-glucosídeo, conforme mostrado na tabela 5.



**Figura 6.** Cromatograma, obtido por HPLC-DAD, do extrato de antocianinas de araçáúna. Picos identificados de acordo com a tabela 5. Condições cromatográficas: ver texto.

**Tabela 5.** Características cromatográficas e espectroscópicas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, e composição das antocianinas do extrato de araquáua.

Pico <sup>a</sup>	Antocianina	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	λ <sub>máx</sub> (nm) <sup>c</sup>	[M] <sup>+</sup> (m/z)	Íons fragmentos obtidos em MS/MS (m/z)	Composição relativa <sup>d</sup> mg cyd 3-glu/100g b.s.		
						Lote 1	Lote 2	Lote 3
1	Delfinidina 3-glucosídeo	12,9 – 13,2	275, 524	465	303[M-162] <sup>+</sup>	46,2±6,0	49,8±1,0	48,2±3,0
2	Cianidina 3-glucosídeo	14,7 – 15,1	280, 517	449	287[M-162] <sup>+</sup>	240,6±3,2	241,5±7,0	241,1±15,0
3	Derivado de delfinidina	19,2 – 19,6	273, 534	nd	549, 493, 423, 365, 301, 257 <sup>e</sup>	4,9±0,6	15,2±0,4	10,2±0,06
4	Derivado de petunidina	20,0 – 20,5	274, 533	nd	481, 317, 257 <sup>e</sup>	0,2±0,1	1,7±0,05	2,7±0,1
5	Derivado de pelargonidina	21,1 – 22,7	273, 528	nd	525, 477, 365, 271 <sup>e</sup>	3,3±0,4	9,5±0,3	2,61±0,01
6	Derivado de cianidina	22,3 – 23,2	275, 530	nd	653, 437, 365, 287 <sup>e</sup>	2,0 ±0,3	0,7±0,02	4,5±0,3
7	Derivado de peonidina	22,7 – 23,5	275, 525	nd	679, 505, 365, 301, 257 <sup>e</sup>	0,7±0,1	1,3±0,1	0,7±0,1

<sup>a</sup> Picos numerados de acordo com a figura 8

<sup>b</sup> Faixa de tempo de retenção na coluna C<sub>18</sub>

<sup>c</sup> Gradiente linear de água/metanol, ambos com 5% de ácido fórmico

<sup>d</sup> Calculado com base na porcentagem de área, utilizando com o área total o conteúdo de antocianinas monoméricas em base seca (Tabela 4).

<sup>e</sup> Fragmentos detectados na fonte (MS).

cyd 3-glu: cianidina 3-glucosídeo

b.s.: base seca

Para a identificação das antocianinas foram considerados os seguintes parâmetros: ordem de eluição dos picos, as características do espectro UV-visível, dados da literatura e principalmente as características dos espectros de massas.

O espectro de massas registrado durante a eluição do pico 1 gerou um íon molecular ( $[M]^+$ ) com  $m/z$  a 465 e fragmentos de MS/MS a  $m/z$  303, indicando que a aglicona delphinidina está ligada à uma hexose, devido à perda de 162 u.

O pico 2 foi identificado como cianidina 3-glicosídeo, considerando  $[M]^+$  a  $m/z$  449 e o fragmento de MS/MS a  $m/z$  287 $[M-162]^+$ , que mostrou a perda de uma hexose. Embora os açúcares não tenham sido identificados, acredita-se que se trata de uma molécula de glicose, uma vez que a cianidina 3-glicosídeo é a antocianina mais abundante na natureza e também é a antocianina majoritária em diversas espécies da família Myrtaceae. Comparando-se estudos de outras frutas pertencentes à esta família como camu-camu (Zanatta et al., 2005), jabuticaba (Reynertson et al., 2006), pitanga (Einbond et al., 2004) e *muntries* (Netzel et al., 2006) pode-se destacar em praticamente todas estas frutas a presença de cianidina 3-glicosídeo como a antocianina majoritária. Seguindo esta mesma analogia, o pico 1 foi identificado como delphinidina 3-glicosídeo.

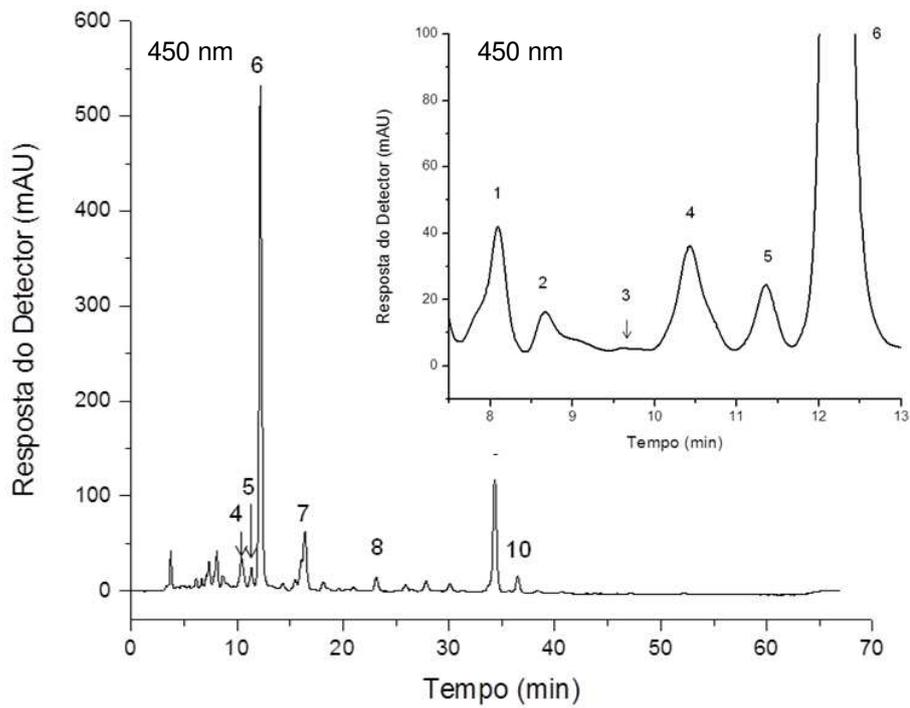
Os picos minoritários são derivados de antocianinas. Foi possível chegar a essa conclusão devido às características dos espectros no UV-visível e dos fragmentos detectados na fonte (MS). O pico 3 é um derivado de delphinidina, apresentando em seu espectro de massas um fragmento de MS a  $m/z$  303, como o pico de maior intensidade. Seguindo o mesmo raciocínio o pico 4 é um derivado de petunidina, o pico 5 derivado de pelargonidina, e o pico 6 derivado de cianidina e o

pico 7 derivado de peonidina. A diferença entre as  $m/z$  de dois fragmentos, 505 u e 301 u, referentes ao pico 7, indicam a presença de uma unidade de hexose acetilada (162 + 42 u) (Cuyckens & Claeys, 2004). Os fragmentos encontrados estão apresentados na tabela 5.

### 5.3.2. Composição de carotenóides

Para a identificação dos carotenóides foi utilizada a combinação dos resultados de ordem de eluição em coluna de fase reversa  $C_{30}$ , características do espectro UV-visível e do espectro de massas, além da comparação de dados da literatura em que as mesmas condições foram utilizadas (Faria et al., 2009). Os carotenóides foram quantificados a partir da área de cada pico em relação à quantidade total descrita no item 5.2. As características utilizadas para a identificação estão apresentadas na tabela 6, enquanto a composição de cada lote está apresentada na tabela 7.

A figura 7 mostra o cromatograma obtido para o extrato de carotenóides obtido do segundo lote, onde 10 carotenóides foram identificados. Os três lotes analisados apresentaram um perfil semelhante quanto à composição de carotenóides (Tabela 7).



**Figura 7.** Cromatograma, obtido por HPLC-DAD, do extrato de carotenóides de araquáua. Picos identificados de acordo com a tabela 5. Condições cromatográficas: ver texto.

**Tabela 6.** Características cromatográficas e espectroscópicas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, e composição de carotenóides de araquáua.

Picos	Carotenóides	t <sub>r</sub> (min)	λ <sub>máx</sub> (nm)	%III/II	[M+H] <sup>+</sup>	Fragmentos MS/MS (m/z)
1	<i>trans</i> -neoxantina	8,1	410, 435, 463	78	601	583 [M+H -18] <sup>+</sup> , 565[M+H -18-18] <sup>+</sup> ,
2	neocromo	8,6	398, 421, 447	83	601	583[M+H -18] <sup>+</sup>
3	auroxantina	9,6	377, 401, 428	100	601	583[M+H -18] <sup>+</sup> , 565[M+H -18-18] <sup>+</sup> , 509[M+H -92] <sup>+</sup> , 547[M+H -18-18-18] <sup>+</sup> , 491[M+H -18-92] <sup>+</sup> , 221
4	<i>cis</i> -luteína 1	10,4	328, 415, 438, 465	30	569	551[M+H -18] <sup>+</sup> , 533[M+H -18-18] <sup>+</sup> , 459[M+H -18-92] <sup>+</sup>
5	<i>cis</i> -luteína 2	11,3	328, 415, 438, 465	32	569	551[M+H -18] <sup>+</sup> , 533[M+H -18-18] <sup>+</sup> , 459[M+H -18-92] <sup>+</sup>
6	<i>all-trans</i> -luteína	12,2	420, 444, 472	63	569	551[M+H -18] <sup>+</sup> , 533[M+H -18-18] <sup>+</sup> , 477[M+H -18-56] <sup>+</sup> , 459[M+H -18-92] <sup>+</sup>
7	5',6'-epóxi-β-criptoxantina	16,4	420, 444, 472	61	569	551[M+H -18] <sup>+</sup> , 535[M+H -18 -18] <sup>+</sup> , 205
8	β-criptoxantina	23,1	421, 450, 477	28	553	535 [M+H -18] <sup>+</sup>
9	β -caroteno	34,3	421, 451, 478	25	537	444 [M-92] <sup>+</sup>
10	9- <i>cis</i> -β-caroteno	36,5	337,420, 446, 472	28	537	444 [M-92] <sup>+</sup>

<sup>a</sup> Picos numerados de acordo com a figura 7.

<sup>b</sup> Tempo de retenção na coluna C<sub>30</sub>

<sup>c</sup> Gradiente linear de metanol/MTBE

<sup>d</sup> Calculado com base na porcentagem de área, utilizando como área total o conteúdo de carotenóides totais (Tabela 5)

**Tabela 7.** Concentração ( $\mu\text{g}/100\text{g}$  b.s.) de carotenóides em diferentes lotes de araquáua.

<b>Carotenóides</b>	<b>Lote 1<sup>a</sup></b>	<b>Lote 2<sup>a</sup></b>	<b>Lote 3<sup>a</sup></b>
<i>All-trans</i> -neoxantina	120,6 $\pm$ 5,0	142,0 $\pm$ 2,1	118,0 $\pm$ 3,0
<i>All-trans</i> -neocromo	58,4 $\pm$ 2,0	55,0 $\pm$ 0,8	56,7 $\pm$ 1,8
<i>All-trans</i> -auroxantina	14,0 $\pm$ 0,6	16,7 $\pm$ 0,2	n.d.
<i>Cis</i> -luteína 1	143,7 $\pm$ 6,1	164,8 $\pm$ 2,3	141,0 $\pm$ 4,7
<i>Cis</i> -luteína 2	70,7 $\pm$ 3,0	82,5 $\pm$ 1,2	60,4 $\pm$ 2,3
<i>All-trans</i> -luteína	1768,7 $\pm$ 75,1	1733,2 $\pm$ 24,5	1523,8 $\pm$ 50,8
5',6'-epóxi- $\beta$ -criptoxantina	142,3 $\pm$ 6,0	234,7 $\pm$ 3,3	177,7 $\pm$ 3,3
<i>All-trans</i> - $\beta$ -criptoxantina	69,8 $\pm$ 3,0	54,0 $\pm$ 7,5	42,7 $\pm$ 1,4
<i>All-trans</i> - $\beta$ -caroteno	356,3 $\pm$ 2,0	474,0 $\pm$ 6,7	396,5 $\pm$ 13,2
9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	43,5 $\pm$ 1,8	53,7 $\pm$ 7,0	42,3 $\pm$ 1,4

<sup>a</sup> Média e desvio-padrão de análises em triplicata.

n.d.: não-detectado

O carotenóide majoritário foi a *all-trans*-luteína, que eluiu em 12,2 min (pico 6). Além da forma *all-trans*, também foram encontrados dois isômeros *cis* (picos 4 e 5). Ambos apresentaram espectro característico de isômeros e efeito hipsocrômico em relação ao isômero *all-trans*, porém não foi possível indicar onde ocorre a isomeria, uma vez que não foi possível calcular %  $A_B/A_{II}$ . A identificação também foi confirmada pelo espectro de massas, com molécula protonada  $[M+H]^+$  a  $m/z$  569, e fragmentos MS/MS a  $m/z$  551  $[M+H-18]^+$  e a  $m/z$  533  $[M+H-18-18]^+$ , indicando presença de grupo com oxigênio devido a perdas consecutivas de duas moléculas de água. Devido às diferenças no espectro de massas entre luteína e zeaxantina, foi possível confirmar o pico 6 como *all-trans*-luteína. A presença de uma hidroxila alílica à ligação dupla no anel ionona faz com que essa seja facilmente eliminada, resultando em um fragmento de 551 u, cuja intensidade foi muito maior em relação ao pico a  $m/z$  569. O MS/MS também mostrou a presença de fragmento MS/MS a  $m/z$  477, resultado da perda de tolueno ( $[M+H-92]^+$ ) da cadeia poliênica.

O segundo carotenóide mais abundante foi o *all-trans*- $\beta$ -caroteno (pico 9), que apresentou um espectro UV-visível bem característico deste composto. Além disso, o espectro de massas mostrou  $[M+H]^+$  a  $m/z$  537 e fragmento MS/MS a  $m/z$  444  $[M+H-92]^+$ , correspondente a perda de tolueno na cadeia poliênica. Esse padrão no espectro de massas também foi observado no pico 10, que eluiu após *all-trans*- $\beta$ -caroteno, e apresentou espectro UV-visível com deslocamento hipsocrômico, e presença do pico *cis*. Comparando a ordem de eluição com o

trabalho de De Rosso & Mercadante (2007) o pico 10 foi identificado como a forma isomérica 9-*cis*- $\beta$ -caroteno.

Os demais picos apresentaram teores muito menores em relação à *all-trans*-luteína e *all-trans*- $\beta$ -caroteno. Como era de se esperar, em colunas de fase reversa, carotenóides com três ou duas hidroxilas eluem antes dos monoidroxilados e estes eluem antes dos carotenos. Assim, o pico 1, foi identificado como *all-trans*-neoxantina, considerando as características do espectro UV-visível e a massa molecular foi confirmada pelo espectro de massas, onde se verificou  $[M+H]^+$  a  $m/z$  601, e eliminação das hidroxilas a  $m/z$  583  $[M+H-18]^+$ , e  $m/z$  565  $[M+H-18-18]^+$ .

O *all-trans*-neocromo (pico 2) eluiu após neoxantina. Além da ordem de eluição, igual ao relatado por Faria et al. (2009) foram observados no espectro de massas  $[M+H]^+$  a  $m/z$  601 e eliminação de apenas uma hidroxila a  $m/z$  583  $[M+H-18]^+$ . Além do mais, a presença de um grupo 5,8-furanóide conferiu a este carotenóide um  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) menor que o da neoxantina.

A  $\beta$ -criptoxantina também foi identificada eluindo antes do  $\beta$ -caroteno. Ambos possuem um espectro visível idêntico, pois possuem o mesmo cromóforo. Porém, a presença de  $\beta$ -criptoxantina foi confirmada pela análise do espectro de massas, com a  $[M+H]^+$  a  $m/z$  553 e fragmento MS/MS a  $m/z$  535  $[M+H-18]^+$  referente a perda de uma hidroxila.

O pico 7 foi identificado como 5',6'-epoxy- $\beta$ -criptoxantina baseado no espectro visível e confirmado pelo espectro de massas, com  $[M+H]^+$  a  $m/z$  569, e fragmentos a  $m/z$  551 em virtude da perda de uma hidroxila, e fragmento a  $m/z$  205, indicando que o epóxido está localizado no anel que não possui hidroxila.

Outras frutas da família Myrtaceae apresentaram padrão semelhante de carotenóides, tendo como majoritários all-*trans*-luteína e o  $\beta$ -caroteno, como por exemplo o camu-camu (Zanatta & Mercadante, 2007) e o jambolão (Faria et al. 2010). No entanto a pitanga e a goiaba, que apresentam uma coloração vermelha característica possuem o licopeno como principal carotenóide (Hart & Scott, 1995; Wilberg e Rodríguez-Amaya, 1995).

## CONCLUSÃO GERAL

Os três lotes coletados de araçauína apresentaram características físico-químicas semelhantes entre si, bem como antocianinas e de carotenóides.

A antocianina majoritária foi a cianidina 3-glucosídeo (2,41 mg/g b.s.). Também foi identificada a delphinidina 3-glucosídeo, além de 5 antocianinas derivadas de delphinidina, petunidina, pelargonidina, cianidina e peonidina em quantidades muito baixas, que somadas totalizaram 3,0-3,2 mg/g de antocianinas em equivalente de cianidina 3-glucosídeo (b.s.).

Em relação aos carotenóides, a quantidade total variou entre 30,0 e 35,4  $\mu\text{g/g}$  b.s.). A luteína foi o carotenóide predominante (15,24 – 17,69  $\mu\text{g/g}$  b.s.), seguida de  $\beta$ -caroteno e dos isômeros *cis* da luteína.

A aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e de espectrometria de massas (HPLC-DAD-MS/MS) mostrou-se uma ferramenta fundamental para a identificação de 2 antocianinas e de 10 carotenóides em araçauína, sendo este o primeiro trabalho a determinar a composição desses pigmentos nessa fruta até o momento. A araçauína mostrou-se ainda uma fonte relevante tanto de antocianinas como de carotenóides.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., Weil J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, 84, 551–562, 2004.

Andersen, O.M., M. Jordheim, M. The anthocyanins. In: Anderson O.M., Markham K.R.: **Flavonoids, Chemistry, biochemistry and applications**, CRC Press, Boca Raton, FL, 471–530, 2006.

Akter, S.; Oh, S.; Eun, J.; Ahmed, M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International**, 44, 1728-1732, 2011.

Azevedo-Meleiro, C. H. & Rodriguez-Amaya D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, 17, 385–396, 2004.

Bagetti, M.; Facco, E. M. P.; Piccolo, J.; Hirsh, G. E.; Rodriguez-Amaya, D. B.; Kobori, C. N.; Vizzotto, M.; Emanuelli, T. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 147-154, 31, 2011.

Bernstein, P. S.; Khachik, F.; Carvalho, L. S.; Muir, G. J., Zhao, D.; Katz, N. B. Identification and Quantitation of Carotenoids and their Metabolites in the Tissues of the Human Eye. **Experimental Eye Research**, 72, 215-222, 2001.

Biehler, E.; Alkerwi, A.; Hoffman, L; Krause, E.; Guillaume, M.; Lair, M. Bohn, T. Contribution of violaxanthin, neoxanthin, phytoene and phytofluene to total carotenoid intake: Assessment in Luxembourg. **Journal of Food Composition and Analysis**, 25, 56-65, 2012.

Bohm, V.; Puspitasari-Nienaber, N.L.; Ferruzzi, M.G.; Schwartz, S.J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lycopene and zeaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 221-226, 2002.

Britto, E.S.; Araujo, M.C.P.; Alves, R.E.; Carkeet, C.; Clevidence, B.A.; Novotny, J.A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolao, jussara, and guajiru. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 55, 9389-9394, 2007.

Britton G. **Overview of carotenoid biosynthesis**. In: Carotenoids, Vol. 3: Biosynthesis and metabolism. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.). Birkhäuser, Basel, p.13-147, 1998.

Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. **Carotenoids - Handbook**. Birkhauser, Basel, 563p., 2004.

Brouillard, R; Delaport, B. Chemistry of Anthocyanin Pigments. 2. Kinetic and Thermodynamic Study of Proton Transfer, Hydration, and Tautomeric Reactions of Malvidin 3-Glucoside. **Journal of American Chemistry Society**, 99, 8461-8468, 1977.

Brouillard, R. **Chemical structure of anthocyanins**. In: Markakis, P. (Ed.) Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press, 1982. p. 1-39.

Brouillard, R., Chassaing, S., Isorez G., Kueny-Stotz, M., Figueiredo, P. The visible flavonoids or anthocyanins: From research to applications. **Recent Advances in Polyphenol Research**, 1-22, 2010.

Catania, A. S.; Barros, C. R.; Ferreira, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabólica**, 53, 550-559, 2009.

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**, 235, 248-259, 2006.

Chiang, L.C.; Cheng, H.Y.; Liu, M.C.; Chiang, W.; Lin, C.C. In vitro evaluation of antileukemic activity of 17 commonly used fruits and vegetables in Taiwan. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, 37, 539–544, 2004

Correa, L. C.; Santos, C. A. F.; Vianello, F.; Lima, G. P. P. Antioxidant content in guava (*Psidium guajava*) and araçá (*Psidium* spp.) germplasm from different Brazilian regions. **Plant Genetic Resources-Characterization And Utilization**, 9, 384-391, 2011.

Clydesdale, F.M. Color as a factor in food choice. **Critical Review Food Science and nutrition**, 33, 83-101, 1993.

Davies, B. H. In: **Chemistry and biochemistry of plant pigments**; Goodwin, T. W., Ed.; Academic Press: London, 1976; Vol. 2, p 38-165.

Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 48, 338-343, 2000.

DeJong, T.M. and E.F. Walton. Carbohydrate requirements of peach fruit growth and respiration. **Tree Physiology**, 5,329-335, 1989.

De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 9135-9141, 2007a.

De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 5062-5072, 2007b.

Di Mascio, P.D.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 274, 532-538, 1989.

Donadio, L.C.; Môro, F.V; Servidone, A.A. **Frutas brasileiras**. Jaboticabal: Novos Talentos, 2002.

Dubick, M.A.; Omaye, S.T.; **Modification of atherogenesis and heart disease by grape wine and tea polyphenols**. In: Wildman, R.E.C. (org). Handbook of Nutraceuticals and Functional Food. Boca Raton: CRC Press, Cap.14, p.235-261, 2001.

Ferreira, J.E.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Degradation of lycopene and  $\beta$ -carotene in model systems and in lyophilized guava during ambient storage: kinetics, structure and matrix effects. **Journal of Food Science**, 73, 589-594, 2008.

Fraser, P.D.; Bramley, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, 43, 228-265, 2004.

Fetter, M. R.; Vizzotto, M.; Corbelini, D. D.; Gonzalez, T. N. Propriedades funcionais de araçá-amarelo, araçá-vermelho (*Psidium cattleianum Sabine*) e araçá-pera (*P. acutangulum D.C.*) cultivados em Pelotas/RS. **Brazilian Journal of Food Technology**, III SSA, 92-95, 2010.

Faria, A.F.; Hasegawa, P.N.; Chagas, E.A.; Pio, R.; Purgatto, E.; Mercadante, A.Z. Cultivar influence on carotenoid composition of loquats from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, 22, 196-203, 2009.

Faria, A.F.; De Rosso, V.V.; Mercadante, A.Z. Carotenoid Composition of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*), Determined by HPLC-PDA-MS/MS. **Plant Foods for Human Nutrition**, 64, 108-115, 2009.

Faria, A. F.; Marques, M.C. ; Mercadante, A. Z. . Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, 126, 1571-1578, 2011.

Gester H. Anticarcinogenic effects of common carotenoids. **International Journal of Nutrition Research**, 63, 93-121, 1993.

Godoy, H. T., Rodriguez-Amaya, D. B.. Occurrence of cis-Isomers of Provitamin A in Brazilian Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42, 1306-1313, 1994.

Godoy, H. T., & Rodriguez-Amaya, D. B. Occurrence of cis isomers of provitamins A in Brazilian vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 3081-3086, 1998.

Gonçalves, A.E.S.S., Lajolo, F.M., Genovese, M.I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 4666–4667, 2010.

Gorelik, S.; Ligumsky, M.; Kohen, R.; Kanner, J.; A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products. **The FASEB Journal**, 22, 41-46, 2008.

Haminiuk, C.W.I.; Vidal, J.R.M.B. Estudo tecnológico dos processos de extração da polpa e do néctar do araçá (*Psidium cattleianum*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Porto Alegre, 18, 2002. Anais... Porto Alegre: CBCTA, 2002. p. 2075-2078. 1 CD.

Hart, D. J.; Scott, K. J. Development and evaluation of a HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chemistry**, 54, 101-111, 1995.

Hou D., Fujii M., Terahara N., and Yoshimoto M. Molecular Mechanisms Behind the Chemopreventive Effects of Anthocyanidins. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 5, 321–325, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 4.ed. São Paulo, 2008. v.1, 1020 p.

Kalt, w.; Lawand, C.; Ryan, D. A. J; McDonald, J. E.; Donner, H. Forney, C. F. Oxygen Radical Absorbing Capacity, Anthocyanin and Phenolic Content of hibush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during Ripening and Storage. **Journal of American Society of Horticulture Science**, 128, 917-923, 2003.

Kang, T.H.; Hur, J.Y.; Kim, HB, Ryu, J.H.; Kim, S.Y. Neuroprotective effects of the cyanidin 3-O-beta-dglucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia. **Neuroscience Letters**, 391,122-126. 2006.

Kay, C. D. Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. **Nutrition Research Reviews**, 19, 137-146, 2006.

Konczac, I. , Zhang, W. Anthocyanins – More than nature’s colours. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 5, 239-240, 2004.

Krinsky, N. I., Johnson, E. I. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516, 2005.

Kristal, A. R. Vitamin a, retinoids and carotenoids as chemopreventive agents for prostate cancer. **The Journal Of Urology**, 171, 54–58, 2004.

Landrum, L.R. & Kawasaki, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, 49, 508-536, 1997.

Lee, J.; Durst, R.W.; Wrolstad, R.E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, 88, 1269-1278, 2005.

Lima, V.L.A.G.; Melo, E.A.; Lima, D.E.S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Sciencia Agrícola**, 59, 2002.

Machado, Adelia Ferreira de Faria. **Identificação e determinação da atividade antioxidante de carotenoides e antocianinas de frutas**. 2010. 225 f. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

Maoka, T.; Mochida, K.; Kozuka, M.; Ito, Y.; Fujiwara, Y.; Hashimoto, K.; Enjo, F.; Ogata, M.; Nobukuni, Y.; Tokuda, H.; Nishino, H. Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *Capsicum annum L.* **Cancer Letters**, 172 103–109, 2001.

Martindale, J. L.; Holbrook, N. J.; Cellular Response to Oxidative Stress: Signaling for Suicide and Survival. **Journal of Cellular Physiology**, 192, 1-15, 2002.

Mazza, G.; Brouillard, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chemistry**, 25, 207-225, 1987.

Mazza, G.; Girard, B.; **Functional grape and citrus products**. In: Functional Foods Biochemical and Processing Aspects. Lancaster: Technomic Publishing Co, p. 139-159, 1998.

Mazza, G. & Miniati, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables and grains**, Boca Raton-Florida (USA): CRC Press. 1993.

Mazza G.J. Anthocyanins and heart health. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**; 43, 369-374, 2007

Mélo, Polyphenol, Ascorbic Acid and Total Carotenoid Contents in Common Fruits and Vegetables. **Brazilian Journal of Food Technology**, 9, 89-94, 2006.

Mercadante, A.Z.; Bobbio, F.O. **Anthocyanins in foods: occurrence and physicochemical properties**. In: Food colorants – chemical and functional properties. Socaciu, C. (Ed.). CRC, New York, p.241-276, 2008.

Mercadante, A.Z. **Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage**. In: Food colorants – chemical and functional properties. Socaciu, C. (Ed.). CRC, New York, p.213-240, 2008.

Miller, N.J.; Sampson, J.; Candeias, L. P.; Bramley, P. M.; Rice-Evans, C. A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. **FEBS Letters**, 384, 240-242, 1996.

Mimuro, M; Katoh, T. Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy. **Pure & Applied Chemistry**, 63, 123-130, 1991.

Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K. & Someya, K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47,1083-1109, 1999.

Montenegro, M. A., Rios, A. D. O., Mercadante, A. Z., Nazareno, M. A., & Borsarelli, C. D. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 367-373, 2004.

Montes, C.; Vicario, I.M.; Raymundo, M; Fett, R.; Heredia, F.J. Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria Jaboticaba* Berg.). **Food Research International**, 38: 983-988, 2005.

Netzel, M. Netzel, G.; Tian, Q.; Schwartz, S.; Konczak, I. Sources of Antioxidant Activity in Australian Native Fruits. Identification and Quantification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 9820-9826, 2006.

Palace, V. P.; Khaper, N.; Qin, Q.; Singal, P. K. Antioxidant potentials of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biology & Medicine**. 26, 746-761, 1999.

Quina, F. H. , Moreira Jr, P. F., Vautier-Giongo, C., Rettori, D., Rodrigues, R. F., Freitas, A. A., Silva, P. F., Maçanita, A. L. Photochemistry of anthocyanins and their biological role in plant tissues. **Pure and Applied Chemistry**, 81, 1687-1694, 2009.

Rao, A.V.; Rao, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, 55, 207-213, 2007.

Reynertson K. A.; Wallace A. M.; Adachi S.; Gil R. R.; Yang H., Basile M.J.; D'Armiento J.; Weinstein I. B.; Kennelly E.J. Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, 69, 1228-30, 2006.

Reynertson, K.A.; Yang, H.; Jiang, B.; Basile, M.J.; Kennelly, E.J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, 109, 883-890, 2008.

Ribeiro, J. C.; Antunes, L. M. G.; Aissa, A. F.; Darin, J. D'arc C.; De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z.; Bianchi, M. L. P. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea Mart.*) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**, 695, 22-28, 2010.

Rímoli, A.O., Arruda, E. J., Rímoli, J., Bueno, N.R. Biodiversity, biotechnology and genetic conservation in local development. **Internacional Local Development**, 1, 21-30, 2000.

Szajdek, A., & Borowska, E. J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, 63, 147-156, 2008.

Schieber, A.; Carle, R. Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. **Trends in Food Science & Technology**, 16, 416-422, 2005.

Strack, D.; Wray, V. **The Anthocyanins**. In: The Flavonoids - Advances in Research since 1986. Harborne, J.B. (Ed.). Chapman & Hall/CRC, New York, p.1-22, 1994.

Simmonds, M. S. J. Flavonoid–insect interactions: recent advances in our knowledge. **Phytochemistry**, 64, 21-30, 2003.

Sumner, M.D.; Elliott-Eller M.; Weidner, G; Daubenmier, J.J.; Chew, M.H.; Marlin, R.; Raisin, C. J.; Ornish, D. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. **American Journal of Cardiology**, 96, 810–814, 2005.

Voutilainen, S.; Nurmi, T.; Mursu, J.; Rissanen, T.H. Carotenoids and cardiovascular health. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 83,1265–1271, 2006.

Vukosavljević, P., Bukvić, B., Janković, M., Mašović, S. Change of anthocyanins content during raspberry extraction. **Journal of Agricultural Sciences**, 48, 85-102, 2003

Wang, H., Cao, G., and Prior, R. L.. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 304-309, 1997.

Wilberg, V. C.; Rodríguez-Amaya, B. D. HPLC quantitation of mayor carotenoids of fresh and processed guava and papaya. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, 28, 474-480, 1995.

Zanatta, C.F., Mercadante, A.Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu–camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, 101, 1526–1532, 2007.

Zechmeister, L. **Cis-trans Isomeric Carotenoids, Vitamin A and Aryl Polyenes**. Academic Press, New York, USA. 1962.